

THESIS

MÜNCH

1969

ZUR FRAGE DER HALTBARKEITSVERLÄNGERUNG  
VON BLUTKONSERVEN DURCH TRASYLOL<sup>R</sup>

WOLFGANG HOLLWECK



*Kurfürstendruck*

*Dipl.-Kfm. A. Koch*

*8 München 13 · Kurfürstenplatz 6*

*Fernsprecher 3421 49/39 9938*



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153307\\_0242](https://archive.org/details/IA40153307_0242)



Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik  
der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

ZUR FRAGE DER HALTBARKEITSVERLÄNGERUNG VON BLUTKONSERVEN  
DURCH TRASYLOL<sup>R</sup>

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Hollweck

aus

München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. F. Marguth

Tag der mündlichen Prüfung: 13.5.1969

# MEINEN LIEBEN ELTERN

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Einleitung                | 1   |
| Die Eltern                | 2   |
| Die Eltern als Kinder     | 3   |
| Die Eltern als Erwachsene | 4   |
| Die Eltern als Partner    | 5   |
| Die Eltern als Freunde    | 6   |
| Die Eltern als Berater    | 7   |
| Die Eltern als Helfer     | 8   |
| Die Eltern als Gegner     | 9   |
| Die Eltern als Feinde     | 10  |
| Die Eltern als Verbündete | 11  |
| Die Eltern als Rivalen    | 12  |
| Die Eltern als Partner    | 13  |
| Die Eltern als Freunde    | 14  |
| Die Eltern als Berater    | 15  |
| Die Eltern als Helfer     | 16  |
| Die Eltern als Gegner     | 17  |
| Die Eltern als Feinde     | 18  |
| Die Eltern als Verbündete | 19  |
| Die Eltern als Rivalen    | 20  |
| Die Eltern als Partner    | 21  |
| Die Eltern als Freunde    | 22  |
| Die Eltern als Berater    | 23  |
| Die Eltern als Helfer     | 24  |
| Die Eltern als Gegner     | 25  |
| Die Eltern als Feinde     | 26  |
| Die Eltern als Verbündete | 27  |
| Die Eltern als Rivalen    | 28  |
| Die Eltern als Partner    | 29  |
| Die Eltern als Freunde    | 30  |
| Die Eltern als Berater    | 31  |
| Die Eltern als Helfer     | 32  |
| Die Eltern als Gegner     | 33  |
| Die Eltern als Feinde     | 34  |
| Die Eltern als Verbündete | 35  |
| Die Eltern als Rivalen    | 36  |
| Die Eltern als Partner    | 37  |
| Die Eltern als Freunde    | 38  |
| Die Eltern als Berater    | 39  |
| Die Eltern als Helfer     | 40  |
| Die Eltern als Gegner     | 41  |
| Die Eltern als Feinde     | 42  |
| Die Eltern als Verbündete | 43  |
| Die Eltern als Rivalen    | 44  |
| Die Eltern als Partner    | 45  |
| Die Eltern als Freunde    | 46  |
| Die Eltern als Berater    | 47  |
| Die Eltern als Helfer     | 48  |
| Die Eltern als Gegner     | 49  |
| Die Eltern als Feinde     | 50  |
| Die Eltern als Verbündete | 51  |
| Die Eltern als Rivalen    | 52  |
| Die Eltern als Partner    | 53  |
| Die Eltern als Freunde    | 54  |
| Die Eltern als Berater    | 55  |
| Die Eltern als Helfer     | 56  |
| Die Eltern als Gegner     | 57  |
| Die Eltern als Feinde     | 58  |
| Die Eltern als Verbündete | 59  |
| Die Eltern als Rivalen    | 60  |
| Die Eltern als Partner    | 61  |
| Die Eltern als Freunde    | 62  |
| Die Eltern als Berater    | 63  |
| Die Eltern als Helfer     | 64  |
| Die Eltern als Gegner     | 65  |
| Die Eltern als Feinde     | 66  |
| Die Eltern als Verbündete | 67  |
| Die Eltern als Rivalen    | 68  |
| Die Eltern als Partner    | 69  |
| Die Eltern als Freunde    | 70  |
| Die Eltern als Berater    | 71  |
| Die Eltern als Helfer     | 72  |
| Die Eltern als Gegner     | 73  |
| Die Eltern als Feinde     | 74  |
| Die Eltern als Verbündete | 75  |
| Die Eltern als Rivalen    | 76  |
| Die Eltern als Partner    | 77  |
| Die Eltern als Freunde    | 78  |
| Die Eltern als Berater    | 79  |
| Die Eltern als Helfer     | 80  |
| Die Eltern als Gegner     | 81  |
| Die Eltern als Feinde     | 82  |
| Die Eltern als Verbündete | 83  |
| Die Eltern als Rivalen    | 84  |
| Die Eltern als Partner    | 85  |
| Die Eltern als Freunde    | 86  |
| Die Eltern als Berater    | 87  |
| Die Eltern als Helfer     | 88  |
| Die Eltern als Gegner     | 89  |
| Die Eltern als Feinde     | 90  |
| Die Eltern als Verbündete | 91  |
| Die Eltern als Rivalen    | 92  |
| Die Eltern als Partner    | 93  |
| Die Eltern als Freunde    | 94  |
| Die Eltern als Berater    | 95  |
| Die Eltern als Helfer     | 96  |
| Die Eltern als Gegner     | 97  |
| Die Eltern als Feinde     | 98  |
| Die Eltern als Verbündete | 99  |
| Die Eltern als Rivalen    | 100 |



# Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung

4

## Theoretischer Teil

Kohlenhydratstoffwechsel der Erythrocyten 5-10

Glykolyse in den Erythrocyten 6

nicht-glykolytischer Stoffwechsel  
der Erythrocyten 7- 8

Energiestoffwechsel der Erythrocyten 8-10

Bisherige Methoden und Ergebnisse der Blut-  
konservierung

Das Auftreten proteolytischer Enzyme in  
Blutkonserven, Aktivierungsmöglichkeiten  
und Bedeutung 13-23

Fibrinolytisches System 14-16

Kallikreinogen-Kallikrein-System 16-18

Kininogen-Kinin-System 19-23

Hemmung proteolytischer Enzyme mit  
Trasylol 24-25

Bisherige Ergebnisse auf dem Gebiet der  
Blutkonservierung mit Trasylol 25-27

Zur Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit 27-28

## Experimenteller Teil und Ergebnisse

Material und Methodik 29-40

Untersuchungsergebnisse 41-62

Ergebnisse der Bestimmungen im Vollblut 41-45

Osmotische Resistenz 41-42

Mechanische Resistenz 42-43

Hämoglobin 43

|                                                            | Seite |
|------------------------------------------------------------|-------|
| Auszählung von Erythrocyten, Leuko-<br>cyten, Thrombocyten | 43-45 |
| Ergebnisse der Bestimmungen im Plasma                      | 45-62 |
| Kalium                                                     | 45-46 |
| Hämoglobin                                                 | 46-47 |
| Saure Phosphatase                                          | 47-49 |
| Glukose-6-phosphatdehydrogenase                            | 49-50 |
| Trypsininhibitor                                           | 52-53 |
| Kallikreininhibitor                                        | 53    |
| Plasmininhibitor                                           | 53-54 |
| Esterasen                                                  | 54-55 |
| Kininasen                                                  | 56    |
| Kininogen                                                  | 56-57 |
| Plasminogen                                                | 58-59 |
| Fibrinogen                                                 | 60-61 |
| Rekalzifizierungszeit                                      | 61-62 |
| Diskussion der Untersuchungsergebnisse                     | 63-71 |
| Zusammenfassung                                            | 72-73 |
| Literaturverzeichnis                                       | 74-78 |

## Einleitung

Die therapeutische Maßnahme einer Bluttransfusion nimmt in der modernen Medizin einen breiten Raum ein. Der damit steigende Verbrauch an Vollblutkonserven stellt hohe Anforderungen sowohl an die Organisation der Blutbanken, vorallem um geeignete Spender in genügender Anzahl zu gewinnen, als auch an die Qualität der Blutkonserven selbst. Neben einer gewissenhaften chemischen, serologischen und blutgruppenserologischen Untersuchung des Spenderblutes ist seine Konservierung im Hinblick auf die spätere Verwendung von größter Bedeutung. Um Konservenblut zu transfundieren, das noch möglichst wenig durch die Lagerung verändert ist, verwendet man in der Regel Blutkonserven, die erst wenige Tage, höchstens aber 2-3 Wochen alt sind.

Eine Verbesserung der derzeit üblichen Stabilisatorgemische in Vollblutkonserven würde durch Erhöhung der Haltbarkeit und Verlängerung der jetzigen Haltbarkeitsfrist nicht nur zu einer bequemerem Vorratshaltung und einer besseren Befriedigung des Spitzenbedarfs führen, sondern es könnten auch Blutkonserven mit selteneren Blutgruppen über längere Zeit gelagert werden.

## Theoretischer Teil

### Kohlenhydratstoffwechsel der Erythrocyten

Die Dauer der Überlebenszeit von Zellen unter anaeroben Bedingungen ist aus biochemischer Sicht eine Frage der glykolytischen Kapazität des Gewebes.

Die ersten Versuche zur Blut- und Plasmakonservierung begannen in den Jahren 1914/15 mit der Entdeckung, daß ein Zusatz von Natrium-Zitrat zu Vollblut die Blutgerinnung verhindert. Bald darauf erkannte man den günstigen Einfluß von Zuckerzusätzen, um die Alterungsvorgänge in der Blutkonserve zu verlangsamen.

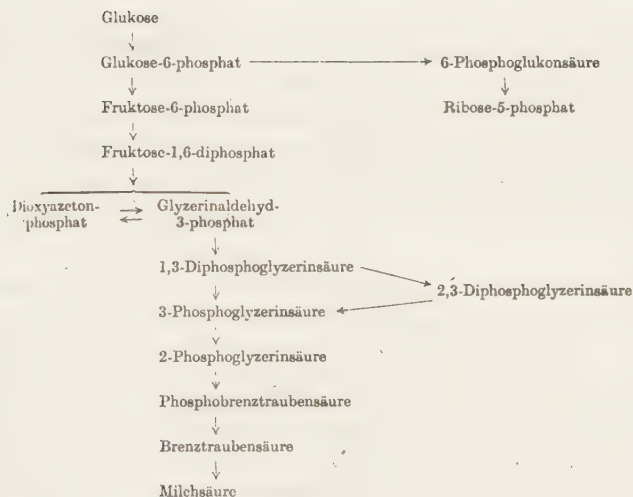
ROUS und TURNER (1) regten 1916 den Zusatz von Glukose und Zitrat an und legten damit den Grundstein zu der noch bis heute verwendeten ACD-Konserve<sup>+</sup>.

Man ging dabei von der Überlegung aus, daß die Erythrocyten ihre Energie in der Konserve aus der anaeroben Glykolyse gewinnen, die durch Zufuhr von Glukose über längere Zeit aufrechterhalten werden könnte.

91-98% der in den Erythrocyten umgesetzten Glukose werden so in Milchsäure übergeführt (2). Die gesamten Erythrocyten eines Menschen (2000 ccm) setzen im Tag rund 20g Glukose um (2). Das entspricht einer Energieausbeute von 6,4 Kcal. Dabei sind an der Blutglykolyse die Erythrocyten zu 80%, die Leukocyten zu 15%, die Thrombocyten zu 3% und die Reticulocyten zu 2% beteiligt.

Die Vollblutkonserven, die bei 4°C gewöhnlich gelagert werden, sind in ihrem Stoffwechsel stark reduziert, sodaß der Glukoseverbrauch dementsprechend verringert ist.

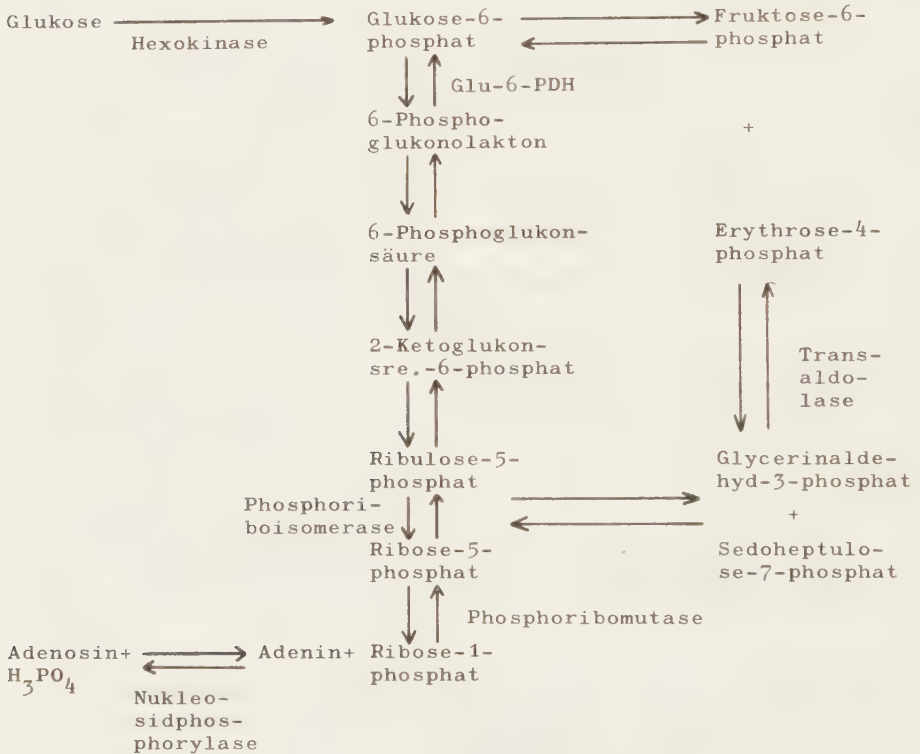
<sup>+</sup>) Zusammensetzung des ACD-Stabilisators: Natr.citr.DAB 6 2,16%, Dextrose 2,34%, Acid.citr.pur.0,5%.



Schematische Darstellung der Glykolyse in den Erythrocyten (n. LANG: Physiologische Chemie der Blutzellen(3)).

Im Gegensatz zu anderen glykolysierenden Zellen haben die Erythrocyten einen hohen Gehalt an 2,3-Diphosphoglycerinsäure. 2,3-Diphosphoglycerinsäure entsteht aus 1,3-Diphosphoglycerinsäure durch Vermittlung der Diphosphoglyceromutase und wird dann weiter durch die 2,3-Diphosphoglyceratphosphatase zu 3-Phosphoglycerinsäure aufgespalten. In anderen glykolysierenden Zellen ist das ein unbedeutender Nebenweg. Über die physiologische Bedeutung dieser in den Erythrocyten vorkommenden Variante ist man noch nicht unterrichtet.

Neben der Glykolyse wird in den Erythrocyten auch ein nicht-glykolytischer Stoffwechselweg eingeschlagen:



Schema des nichtglykolytischen Stoffwechselweges der Erythrocyten (n.LANG: Physiologische Chemie der Blutzellen (3)).

Wie schon oben erwähnt, stellt aber die anaerobe Glykolyse den Hauptlieferanten für den Energiebedarf der konservierten Ery-

throcyten dar.

### Energiestoffwechsel der Erythrocyten

In Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels der Erythrocyten stellten verschiedene Autoren(4,5) fest, daß in alternden Blutzellen, besonders in den kernlosen Erythrocyten und Thrombocyten die Aktivitäten der Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase(PGADH) und der Glukose-6-phosphatdehydrogenase(Glu-6-PDH)im Vergleich zu anderen Enzymaktivitäten stärker abnehmen.

Um die Bedeutung eines Aktivitätsabfalls dieser Enzyme verständlich zu machen, ist eine kurze Charakterisierung des Energiestoffwechsels der Erythrocyten erforderlich.

Die Hauptenergie bezieht der Erythrocyt aus der anaeroben Glykolyse, die nach dem Schema von EMDEN und MEYERHOF abläuft. Die Erythrocyten verlieren nämlich im Verlauf ihres komplizierten Reifungsprozesses, insbesondere bei der Umwandlung vom Reticulocyten in den Erythrocyten die Fähigkeit der Atmung. Die Strukturen der Mitochondrien und Ribosomen werden aufgelöst, Synthesevorgänge kommen zum Erliegen und die Atmung sinkt auf 2% ihrer früheren Intensität ab.

Es wird jedoch auch die Glykolyse verringert und der ATP-Spiegel fällt ab.

Auslösend für diese drastischen Vorgänge sollen Hemmstoffe sein, die an der Atmungskette angreifen.

Dabei kommt es zu einer Senkung der Aktivität von SH-Enzymen, die dazu führt, daß die Hexokinase als ausgeprägtes SH-Enzym zum Schrittmacher der Glykolyserate wird. Nach dem Ausfall der Atmungskette muß der Erythrocyt die Energie zur Aufrechterhaltung seiner Struktur, der selektiven Membranpermeabilität für die verschiedenen Elektrolyte und der Struktur-erhaltung des Hämoglobins aus der Substratkettenphosphorylierung gewinnen.

Bei diesem Vorgang wird durch die Phosphoglyceratkinase der

Phosphatrest der 2,3- Diphosphoglycerinsäure auf ADP übertragen. Damit entstehen 3-Phosphoglycerinsäure und ATP.

Wie jede Zelle, so verfügt auch der Erythrocyt über einen gewissen Energiepool, der in der hohen Konzentration an 2,3-Diphosphoglycerinsäure zu suchen ist.

Diese, wie oben ausführlich dargelegt, im Nebenschluß der Glykolyse liegende Bildung von 2,3-Diphosphoglycerinsäure ist zwar mit dem Verlust der in der Acylphosphatbindung der 1,3-Diphosphoglycerinsäure enthaltenen Bindungsenergie erkaufte, doch kann beim Abbau des 2,3-Diphosphoglycerats über das 2-Phosphoglycerat und das Phosphoenolpyruvat zum Pyruvat die Energie der Enolphosphatbindung in Form von ATP gewonnen werden.

Außer den an der Glykolyse beteiligten SH-Enzymen (Hexokinase und Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase) sind auch die beiden SH- Dehydrogenasen des Pentosephosphatzyklus, Glukose-6-phosphatdehydrogenase und 6-Phosphoglukonsäuredehydrogenase für die ständige Reduktion des entstehenden Methämoglobins über das entsprechende Reduktasesystem wichtig. Der ausgeprägte Pentosephosphatzyklus liefert die hierfür erforderlichen Reduktionsäquivalente in Form von TPNH + H<sup>+</sup>.

Die Erhaltung der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins in der für den O<sub>2</sub>- Transport wichtigen Häm-Form ist besonders wichtig, da die Transfusion einer Vollblutkonserve nicht nur die Korrektur verlorengegangenen Volumens darstellt, sondern auch die Zufuhr von O<sub>2</sub>- transportierender Aktivität, die mit dem Vorliegen von Methämoglobin erlischt.

Einen wesentlichen Stabilisator für diese SH-Enzyme stellt die hohe Glutathionkonzentration und das Reduktasesystem dar, wobei die menschlichen Erythrocyten einen Gehalt von rd. 75 mg% Glutathion aufweisen (3).

LÖHR und WALLER (5) sprechen von den beiden SH- Dehydrogenasen, die im Verlauf der Zellalterung einen besonders schnellen Aktivitätsverlust erleiden, geradezu von "Prädilektionsstellen der

Zellalterung".

Ein Aktivitätsverlust der Glukose-6-phosphatdehydrogenase hat somit zur Folge, daß einmal die für die Methämoglobinreduktion notwendigen Reduktionsäquivalente fehlen und zum anderen eine Verringerung der Bildung von Ribose-5-phosphat über den Pentose-phosphatzyklus. Da aber Ribose-5-phosphat das Ausgangsprodukt für die Synthese von Mono- und Dinukleotiden darstellt, ist damit die ATP-Synthese betroffen, zumal dann, wenn das notwendige Adenin durch Desaminierung verloren geht.

Eine Hemmung oder ein Verlust der Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase-Aktivität kommt der Hemmung der Glykolyse gleich, d.h. es werden sich die Zwischenstoffkonzentrationen vor dem 1,3-Diphosphoglycerat anhäufen. Damit ist die Substratkettenphosphorylierung als einzige Möglichkeit der Erythrocyten, Energie zu gewinnen, ebenfalls vermindert.

#### Bisherige Methoden und Ergebnisse der Blutkonservierung

Die Kenntnis des Erythrocytenstoffwechsels führte dazu, daß die verschiedensten Effektoren dem Blut zur Stabilisierung des Energiestoffwechsels der Erythrocyten zugesetzt wurden.

Die ACD-Stabilisierung beinhaltet eine Aufhebung der Blutgerinnung, Zufuhr des Glykolysesubstrats Glukose, sowie durch die Einstellung des pH-Werts auf etwa pH=7,1 eine bevorzugte Einschleusung der 2,3-Diphosphoglycerinsäureenergieserven. Außerdem bleibt der pH-Wert annähernd stabil trotz der erhöhten Milchsäureproduktion in der lagernden Konserve.

Als Konsequenz der Kenntnisse über den Abbauweg des ATP versuchte man eine Substitution der verlorengegangenen Nukleosidäquivalente.

ABRAHAM und Mitarb. (6) setzten normalen ACD-Konserven Inosin zu und konnten dadurch eine Resynthese von ATP und eine Zunahmer der Konzentration von organischen Phosphatestern (2,3-Diphosphoglycerinsäure) erreichen. Inosin tritt in die Zelle ein, wird dort phosphoryliert und liefert unter Abspaltung der Purinbase Ribose-1-phosphat, was dann unter Energiegewinn für die Zelle weiter abgebaut wird (siehe Schema S.7). Die Autoren sahen

durch den Inosinzusatz einen Wiedereintritt von Kalium in die Zelle und einen mit Wasserverlust verbundenen Naträumausstrom aus der Zelle. Damit wurde eine im Vergleich zu Erythrocyten aus gleich alten ACD-Konserven ohne den Inosinzusatz höhere osmotische Resistenz und eine verlängerte Überlebenszeit *in vivo* erzielt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam SCHMITT (7) mit Inosinzusatz zu ACD- Konserven. Anhand der Bestimmung der osmotischen Resistenz, des Kaliumanstiegs im Plasma und der Überlebenszeit der Erythrocyten durch Radiochrommarkierung wurde die Lagerfähigkeit überprüft. Durch den Zusatz von 1200  $\mu\text{mol}$  Inosin auf 100 ml ACD-Blut konnte die Lagerzeit auf 6 Wochen ausgedehnt werden. Der Autor sieht diese positive Wirkung im Zusammenhang mit der Schaffung energiereicher Substanz in Form von Diphosphoglycerinsäure durch das Inosinmukleosid.

FISCHER und Mitarb. (8) setzten den ACD- Konserven außer Inosin noch Adenosin und Guanosin zu und konnten damit einen nur unwesentlichen Abfall der mechanischen Resistenz der Erythrocyten während einer 50- tägigen Lagerung sehen. Ähnliche Wirkung wurde mit dem Zusatz von NNR- Kortikoiden (Prednisolon) erzielt und auf die "membranabdichtende" Wirkung des Glukokortikoids bezogen.

Andere Untersucher konnten ebenfalls mit einem Nukleosidzusatz die Erythrocyten in der Blutkonserve stabilisieren (9, 10, 11, 12, 13).

Eine Stabilisierung des Erythrocytenstoffwechsels durch SH-Komponenten, die ein ähnliches Redoxpotential wie das GSH-GSSG-System (Glutathion-SH) der Erythrocyten besitzen, war allein theoretisch zu fordern.

So wurde eine Schutzwirkung der SH- Enzyme Glu-6-PDH und PGADH durch Cysteinenzusatz gefunden, was sich in einem verzögerten Auftreten der Hämolyse während der Lagerung äußerte (14).

Dem Vitamin E ( alpha-Tocopherol) wurde ebenfalls ein günstiger Einfluß auf die Lagerfähigkeit von Blutkonserven zugeschrieben. Die Erythrocyten zeigten dabei eine Erhöhung ihrer Resistenz gegenüber hämolytischen Einflüssen (15,16). LIPP (17) sah nach Zugabe von 100 mg  $\alpha$ - Tocopherolacetat zu 100 ml ACD-Blut nach 7 Wochen einen geringeren Hämolysegrad gegenüber der Vergleichskonserven, jedoch verwischte sich der Unterschied nach 3 Monaten weitgehend. Durch Vorbehandlung von Blutspendern mit  $\alpha$ - Tocopherol konnte die Hämolyserate in Herz-Lungenmaschinen herabgesetzt werden (18).

Die längsten Konservierungszeiten erreichte man durch Tiefkühlgefrierung von Erythrocyten bei Temperaturen von  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-120^{\circ}\text{C}$ .

Die Erythrocyten wurden dabei in einem Glycerinmilieu teilweise bis zu 2 1/2 Jahren aufbewahrt ( 19,20,21,22,23 ). Es wurde nach Retransfundierung dieser so gelagerten Erythrocyten mit Hilfe der Radiochrommarkierung nachgewiesen, daß 63% der ursprünglichen Zellzahl noch nach einem Jahr biologisch nutzbar war. (20)

Neben den Möglichkeiten, stabilisierend in den Erythrocytenstoffwechsel einzugreifen und durch eine möglichst optimale Energieproduktion den Erhaltungsstoffwechsel der Erythrocyten über lange Zeit anaerob aufrecht zu erhalten, ist es nicht weniger wesentlich, die dem Blut eigene Funktion der Gerinnung bei der Lagerung von Erythrocyten zu beobachten.

Es ist lange bekannt, daß die Gerinnungsvorgänge an nicht benetzbaren Oberflächen, insbesondere die Aktivierung des Hagemannfaktors, langsamer ablaufen.

Es lag daher nahe, statt Glasflaschen zur Lagerung Plastikbehälter zu verwenden. Dadurch sollte es neben einem verlangsamten Abfall der wesentlichen Gerinnungsfaktoren auch zu einer Stabilisierung der Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten kommen ( 24,25,26 ).

Auch die Verschiebung der Elektrolytkonzentrationen spielen eine Rolle bei der Lagerung von Erythrocyten. Durch einen dem Plastikbeutel vorgelagerten Ionenaustauscher kann der größte Teil der Kalzium- und Kaliumionen schon während der Blutentnahme vom Spender eliminiert werden. Das so gewonnene Konservenblut ist frei von Zusätzen. Es gerinnt nicht und enthält weniger Kalium, was sich bei dem unvermeidlichen Kaliumanstieg im Plasma der Konserve bei der Lagerung günstig auswirkt. Das so erhaltene "Kationitblut" sollte aber schon innerhalb der ersten Lagerungstage verbraucht werden (27).

#### Auftreten proteolytischer Enzyme in Blutkonserven, Aktivierungsmöglichkeiten und Bedeutung

Neben den Veränderungen, die die geformten Bestandteile des Blutes während der Lagerung erfahren, ist das Verhalten der Eiweißbestandteile des Plasmas, insbesondere der Gerinnungsfaktoren von entscheidender Bedeutung.

Die Veränderungen der Gerinnungsfaktoren sind immer mit proteolytischen Vorgängen verknüpft. Man diskutiert darüber hinaus, inwieweit auch andere proteolytische Aktivitäten, die im Laufe der Lagerung von Blutkonserven entstehen, zu einer Schädigung besonders der Membranselektivität der Erythrocyten beitragen könnten. Dabei hat eine Proteolyse von Plasma-proteinen durch solch proteolytische Aktivitäten sicherlich nur dann Interesse, wenn bei diesem Vorgang, der quantitativ gesehen gering sein kann, bedeutende Plasmaproteinfractionen, die für den Gerinnungsvorgang von Bedeutung sind, unspezifisch abgebaut werden. Die Vollblutkonserve würde somit die physiologische Funktion der Gerinnung nicht mehr besitzen. Daneben haben wir heute Kenntnis von biologisch hochaktiven Plasmafaktoren, die durch proteolytische Vorgänge in Freiheit gesetzt

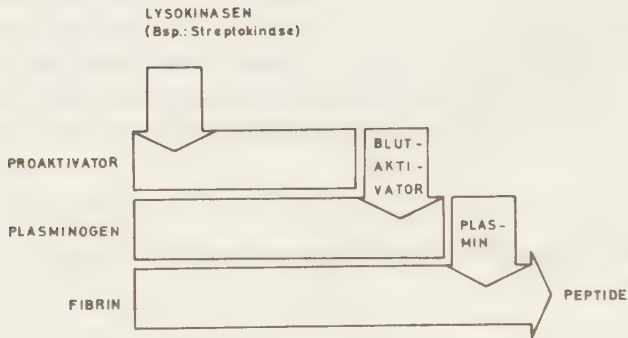
werden. Als letztes käme noch eine direkte Schädigung der Erythrocytenmembranen durch proteolytische Enzyme hinzu.

Eine der Hauptaufgaben der vorliegenden Arbeit bestand darin, diese proteolytischen Vorgänge in einer Blutkonserve während der Lagerung nachzuweisen. Von besonderer Bedeutung war dabei die Rolle des fibrinolytischen Systems und des Kallikreinogen-Kallikrein- Kinin-Systems. Das weitere Interesse galt der Inhibierung ihrer Endprodukte, nämlich des Plasmins und des Kallikreins und einer damit eventuell erreichbaren Verbesserung der Lagerungsbedingungen für Blutkonserven.

An den Anfang der weiteren Betrachtungen möchte ich eine Erläuterung der Fibrinolyse und dann vor allem des Kallikreinsystems geben.

### Fibrinolytisches System

In weitgehender Analogie zum Blutgerinnungsvorgang handelt es sich bei der Fibrinolyse ebenfalls um einen enzymatischen Prozeß. Die irreversible Aufspaltung des Fibrins in Peptide wird durch eine Protease, das Plasmin, bewirkt, das unter bestimmten Bedingungen durch Wirkung von Aktivatoren aus einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, gebildet wird. Neben einer intravasalen Aktivierung des Plasminogens kommt es ähnlich dem Gerinnungsvorgang auch zur extravasalen Aktivierung, wobei die intravasale Plasminogenaktivierung über einen Proaktivator- Aktivatormechanismus abläuft (s.S.15).



Aktivierungsablauf des humoralen fibrinolytischen Systems (n. EGLI, H. (28)).

Wichtigste Funktion der Fibrinolyse ist die Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts zwischen Gerinnung und Unterdrückung der Gerinnung bzw. Wiederauflösung eines Fibringerinnsels, wenn es seine hämostatische Aufgabe erfüllt hat.

Neben Fibrin und Fibrinogen vermag Plasmin, wenn es in hoher Aktivität vorliegt, auch noch die Gerinnungsfaktoren V und VIII abzubauen.

Die extravasale Fibrinolyse wird durch einen Gewebsaktivator vermittelt, der unmittelbar Plasminogen zu aktivieren vermag.

In letzter Zeit wurde mehrfach von einem Ansteigen fibrinolytischer Aktivität in lagernden Blutkonserven berichtet (29,30,31). Gleichzeitig mit dem Anstieg der fibrinolytischen Aktivität wurde eine kontinuierliche Abnahme von Fibrinogen, Fibrin, Faktor V und Faktor VIII beobachtet und miteinander ursächlich in Verbindung stehend diskutiert (31).

### Das Kallikreinogen-Kallikrein-Kinin-System

Die im Blut enthaltenen Plasmakallikreine sind Enzyme mit einer hochspezifischen proteolytischen und einer weniger spezifischen esterolytischen Aktivität.

1925 führte die Beobachtung einer blutdrucksenkenden Wirkung von Harn durch E.K. FREY zur Auffindung des Harnkallikreins und später der Kallikreine aus Serum, Pankreas und Glandula submaxillaris (32).

Bei späteren Untersuchungen mit Harnkallikrein am isolierten Hundedarm fanden WERLE und Mitarb. 1937 (32,33), daß durch Zusatz von Serum die kontrahierende Wirkung des Kallikreins um ein Vielfaches gesteigert werden konnte. Eine Wirkung, zu der Kallikrein allein nicht befähigt war. WERLE schloß daraus, daß durch die Vermittlung von Kallikrein eine Substanz (später Kallidin genannt) im Serum aus einer inaktiven Vorstufe, dem Kallidinogen, freigesetzt wird.

Es wurde weiter erkannt, daß die pharmakologischen Wirkungen des Kallikreins über die Bildung von Kallidin zustande kommen.

1949 wurde von ROCHA E SILVA (34) eine niedermolekulare Substanz entdeckt, die bei Inkubation von Serum mit Schlangengift oder Trypsin entsteht und eine langsame Kontraktion am Meerschweinchendarm hervorruft. Sie wurde deshalb Bradykinin genannt, die im Serum vorhandene inaktive Vorstufe Bradykininogen. Aus dem Bradykinin wurde die Gruppenbezeichnung "KININE" abgeleitet.

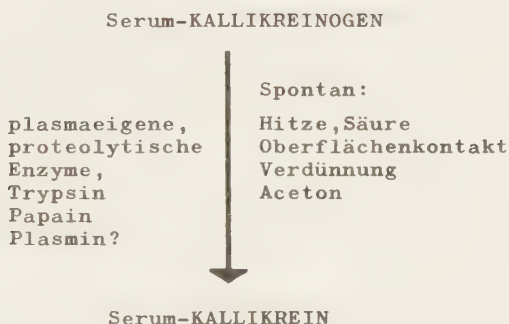
### Freilegung von Kallikrein

Plasmakallikrein liegt in vivo ausschließlich in einer inaktiven Form vor.

Diese inaktive Vorstufe des Kallikreins, das Kallikreinogen, kann bereits durch geringste Veränderungen der physiologischen Bedingungen, möglicherweise durch Abspaltung eines Inaktivatormoleküls aktiviert werden. Das Kallikreinogen-Kallikrein-System im Blut ist also ein sehr labiles System. 1936 konnte WERLE durch die Behandlung des Serums mit Säuren, Aceton, proteolytischen Enzymen oder durch Caseinadsorption aktives Kallikrein gewinnen (35). Eine weitere Möglichkeit, aktives Kallikrein zu gewinnen, bietet das Erhitzen im sauren Milieu, Oberflächenkontakt, z.B. Glas, und die alleinige Serumverdünnung (36).

Die Kallikreinaktivierung durch Plasmin in vivo ist nicht gesichert (37, 38). Trotz des weitgehend identischen Verhaltens von Plasmin und Serumkallikrein gegen Inhibitoren konnte bei einem Vergleich der Eigenschaften, besonders der Enzym-

vorstufen keine Identität oder gegenseitige Beeinflussung festgestellt werden(39).



Freilegungsmöglichkeiten für aktives  
Serum-Kallikrein.

Eine Freilegung von aktivem Kallikrein in lagernden Blutkonserven ist nach dieser kurzen Skizzierung der Aktivierungsmöglichkeiten durchaus denkbar. Prinzipiell wäre eine solche Aktivierung durch plasmaeigene proteolytische Enzyme, durch proteolytische Enzyme aus den geformten Bestandteilen des Blutes, vor allem aus den Leukocyten, die beim zunehmenden Zellzerfall in lagernden Blutkonserven ins Plasma austreten, und schließlich durch den Glaskontakt möglich. Eine Aktivierung durch Trypsin erscheint unwahrscheinlich, da das Blutplasma eine hohe Aktivität an Trypsin-Inhibitor aufweist.

## Das Plasmakininogen- Kinin- System

Die am eingehendsten untersuchten Kinine, von denen es etwa 25 verschiedene Vertreter gibt, die sich untereinander durch unterschiedlichen Freisetzungsmechanismus und unterschiedliche Substratauswahl unterscheiden, sind das Dekapeptid Kallidin, von WERLE 1937 und das Nonapeptid Bradykinin, von ROCHA E SILVA 1949 entdeckt.

Beide Substanzen sind sich in ihrem pharmakologischen Verhalten durchaus ähnlich und unterscheiden sich dabei nur in quantitativer Hinsicht.

Sie werden aus inaktiven Vorstufen, den Kininogenen, freigesetzt ( Kallidinogen, Bradykininogen ). Für diese inaktive Vorstufe im Serum wird ein Molekulargewicht von etwa 10 000 angenommen. Sie befindet sich als  $\alpha_2$ - Globulin in der Cohn'schen Fraktion IV-6 und teilweise in Fraktion IV-5. Die zur Kininbildung befähigten Enzyme sind kininogenasen, die kininabbauenden Enzyme Kininasen (41).

### Freisetzung der Plasmakinine durch Kininogenasen

Die spontane Kininfreisetzung aus Plasma durch Erhitzen im sauren Milieu, durch Oberflächenkontakt und durch Verdünnung ist auf die bereits erwähnte Kallikreinaktivierung zurückzuführen (42).

Die Bradykininliberierung aus frischem Plasma erfolgt durch Trypsin. Eine maximale Ausbeute an Bradykinin erhält man mit hitzedenaturiertem Plasma durch Trypsin, während im gleichen Plasma nach Erhitzen, vorallem im sauren pH-Bereich, bei Inkubation mit Kallikrein eine maximale Kallidinfreilegung nachweisbar ist, die aber die maximale Kininmenge, die mit

Trypsin freilegbar ist, nicht erreicht (43). Die Ursache für dieses Verhalten liegt im breiteren Wirkungsspektrum des Trypsins, wobei das Kininogenmolekül, besonders nach Entfaltung des Eiweißmoleküls durch Hitzedenaturierung, der spezifischen bradykininbildenden Aktivität zugeführt wird, während das Kallikrein eine hohe Substratspezifität aufweist und zur Ausübung seiner spezifisch kininbildenden Wirksamkeit möglicherweise Haftstellen im Eiweißsubstratmolekül benötigt, die nur im nativen Zustand in spezifischer Konformation vorhanden sind (44).

Das Serumkallikrein nimmt in der Reihe der Kallikreine aus Harn, Glandula submaxillaris und Pankreas eine Sonderstellung ein, insofern, als durch seine Vermittlung im Plasma Bradykinin gebildet wird und nicht wie zu erwarten Kallidin.

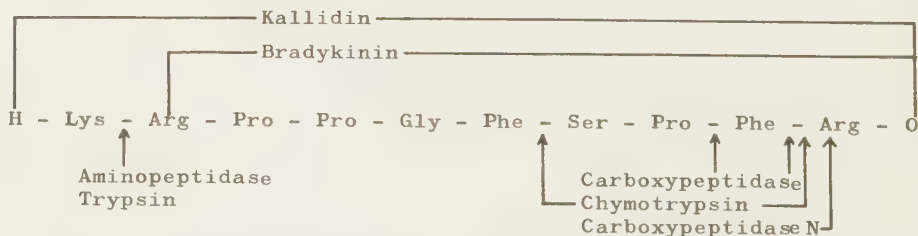
Die Kininfreisetzung durch Plasmin wurde beschrieben, ist aber nach wie vor nicht gesichert.

So untersuchte LEWIS den Einfluß des Plasminsystems auf die Kininbildung und fand mit unreinem Plasmin tatsächlich eine Freisetzung von Kinin aus Plasma in vitro (45,46). Eine Kininbildung durch Plasmin konnte ebenso von BACK (47) in vitro nachgewiesen werden. In vivo allerdings konnte eine kininfreilegende Aktivität von Plasmin nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise beruht die kininfreisetzende Wirkung des Plasmins jedoch in vitro auf einer Verunreinigung der Präparate mit aktivem Hagemann-Faktor, der die Überführung einer Komponente A in eine aktivierte Komponente A verursacht. In der Folgereaktion führte letztere mit einer Komponente B zur Freisetzung von Plasmakininen (48). Die Aktivierung des Hagemann-Faktors erfolgt durch seine Adsorption an Oberflächen. Andererseits wird die Freisetzung von Plasmakininen durch den Hagemann-Faktor derart interpretiert, daß der Hagemann-Faktor erst einen Permeabilitätsfaktor PF freisetzt und dieser wiederum Kallikreinogen in Kallikrein überführt. Kallikrein setzt dann die Plasmakinine frei. WEBSTER (50)

vermutet deshalb eine Identität des Freisetzungsmechanismus für Komponente A und Permeabilitätsfaktor PF, möglicherweise auch eine Identität der Enzyme selbst. Nach anderen Autoren (49) soll Plasmin direkt mit Komponente B oder über eine Aktivierung der Komponente A Anteil an der Kininfreisetzung haben.

Ein Auftreten aktiver Plasmakinine in lagernden Blutkonserven wäre theoretisch denkbar. Eine Freisetzung aus ihren inaktiven Vorstufen wäre in diesem Fall durch Serumkallikrein (BRADY-KININ), Plasmin, plasmaeigene proteolytische Enzyme mit tryptinähnlicher Wirkung und den Hagemann-Faktor möglich. Daß sie ihre pharmakologischen Wirkungen in der Konserve oder bei der Transfusion entfalten, ist unwahrscheinlich, da anzunehmen ist, daß sie in diesem Fall nur langsam freigesetzt werden und sofort durch Kininasen abgebaut werden. Eine kontinuierliche langsame Freisetzung von Plasmakinen während der Lagerungszeit müßte sich in einem Verbrauch der Kininvorstufen im Plasma (Kininogene) bemerkbar machen.

#### Abbau der Kinine, KININASEN



Enzymatischer Abbau von Kininen (n.HABERMANN 41).

Die im Serum enthaltene Kininase ist eine Exopeptidase vom Typ der Carboxypeptidasen. Diese Carboxypeptidase N (51) ist in der Cohn'schen Fraktion IV-1 von menschlichem Plasma enthalten. Die Spaltung von Bradykinin und Kallidin erfolgt an der Peptidbindung des C-terminalen Arginins. Eine nahezu vollständige Inaktivierung des abbauenden Enzyms ist durch eine Inkubation des Plasmas für 15 Minuten bei 37°C und pH = 2 möglich.

#### Pharmakologische Wirkung der Plasmakinine

Die Kinine sind biologisch hochaktive Polypeptide und gehören zur Gruppe der Gewebshormone, die in wechselnder Konzentration im Organismus teils als inaktive Vorstufe, teils in aktiver Form vorkommen. Von den anderen Gewebshormonen unterscheiden sie sich durch die Gleichartigkeit ihrer pharmakologischen Eigenschaften.

Hier stehen im Vordergrund die periphere Gefäßerweiterung (therapeutisch genützt in Form des Padutins<sup>R</sup>, Handelspräparat der Fa. Bayer), die Erregung der glatten Muskulatur, die Erhöhung der Kapillarpermeabilität, die Stimulierung der Leukocytenmigration und die Schmerzerzeugung.

Als Ursache für die Erhöhung der Kapillarpermeabilität wird neben einer Vasokonstriktion kleinerer Venen am Injektionsort und damit einer Druckerhöhung in den vorgeschalteten Venolen eine eigene permeabilitätssteigernde Wirkung der Plasmakinine angesehen. Es muß also durch die Kininwirkung zu einer Membranschädigung an Kapillaren und Venolen kommen, die in einer Schwellung der Endothelzellen ihren mikroskopisch sichtbaren Ausdruck findet (52).

An dieser Stelle erhebt sich die Frage, ob in lagernden Blutkonserven entstehende Plasmakinine imstande sind, die selektive Membranpermeabilität vorallem der Erythrocyten zu stören. Es müßte sich dann bei der Unterbindung der Freilegung von Plasmakinen ein stabilisierender Einfluß auf die Erythrocytenmembran bemerkbar machen.

Die Untersuchungen über die Bedeutung der Kinine in Physiologie und Pathologie haben noch keine eindeutigen Ergebnisse gebracht. Zweifelsohne sind die Kinine bei der Regulierung der funktionellen Durchblutungsänderung in Drüsen und bei der Entstehung eines Kreislaufschocks beim Freiwerden proteolytischer Enzyme in der Blutbahn von Bedeutung.

An dieser Stelle möchte ich zusammenfassend die Bedeutung des Auftretens proteolytischer Enzyme in lagernden Vollblutkonserven anführen:

Direkter Abbau von Plasmaproteinen, vorallem der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Fibrin, Faktor V, Faktor VIII. Die Konserve wird dadurch minderwertig, weil nach der Transfusion keine physiologische Gerinnung gewährleistet ist.

Direkter Abbau von Proteinen, speziell von Kininogen, das bei der Spaltung biologisch hochaktive Substanzen ergibt-KININE- und daher bei der Transfusion als schockbegünstigender Faktor angesehen werden muß.

Freisetzung von Kininen durch Kallikrein aus einer inaktiven Serumvorstufe, dem Kininogen, und Beeinflussung der selektiven Membranpermeabilität der Erythrocyten durch die entstehenden Kinine.

Direkte proteolytische Membranschädigung und damit frühzeitiger Zellzerfall, der wiederum aktivierend auf Blutgerinnung und Fibrinolyse einwirkt (Gewebsaktivatoren).

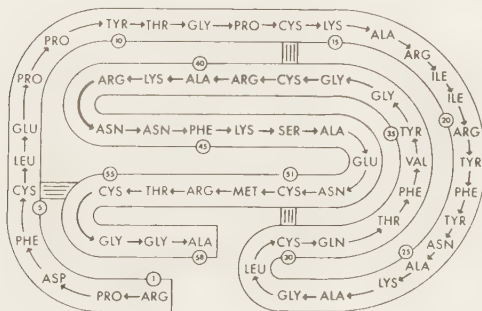
Hemmung proteolytischer Enzyme mit einem Inhibitor aus Rinderorganen,Trasylol<sup>R</sup>

Der Wirkstoff des Trasylols ist der Kallikrein-Inhibitor, der 1930 von FREY, KRAUT und WERLE in Gewebsextrakten aus Parotis, Milz, Leber, Lunge und Lymphknoten des Rindes gefunden wurde.

WERLE fand 1952, daß dieser Kallikrein-Inhibitor auch einen Hemmkörper für Trypsin und Chymotrypsin darstellt.

Darüber hinaus weiß man heute, daß sich die Hemmung auch auf Plasmin und einige Bakterienproteinasen erstreckt.

Der Inhibitorgehalt ist in der Rinderlunge am größten (1000 KIE/g Gewebe), sodaß dieses Organ als Ausgangsmaterial zur Reingewinnung des Inhibitors gewählt wurde. Chemisch handelt es sich um ein basisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 6500. Dabei sind 16 verschiedene Aminosäuren in einer Kette aus 58 Aminosäuren verbunden.



Räumliche Struktur des Kallikrein-inhibitors(Trasylol).

Das Hemmspektrum von Trasylol umfaßt im einzelnen folgende Werte(52):

Je nach verwendetem Trypsin vermag 1 KIE (= Kallikrein-inhibitor-Einheit) 0,56-0,70  $\mu$ g Trypsin zu hemmen.

1 KIE hemmt 0,44  $\mu$ g Chymotrypsin.

1 KIE hemmt 2 KE (= Kallikrein-Einheit) zu 50 %.(Die tatsächliche Hemmung von 1 KE durch 1 KIE beträgt nur 55-65 %.Bei einem Mittelwert für das Pankreaskallikrein von 1 KE = 0,102 E (= internationale Enzym-Einheit)entspricht also 1 KIE 0,056-0,066 IE(= internationale Inhibitor-Einheit)).

1 KIE hemmt 0,0094 NOVO-Einheiten Plasmin (Aktivierungseinheit der Fa.NOVO) oder 0,0385 mE (= internationale Enzym-Millieinheiten).

Bisherige Ergebnisse auf dem Gebiet der Blutkonservierung mit Zusatz des Kallikrein-Inhibitors Trasylol

In lagernden Vollblutkonserven kommt es in relativ kurzer Zeit zu einer deutlichen Verminderung an Gerinnungsfaktoren.Von diesem Prozeß werden vor allem Faktor V und Faktor VIII betroffen,aber auch Fibrinogen und Prothrombin erfahren einen deutlichen Wirkungsverlust(53).So fand JANDA(54) nach 21-tägiger Lagerungszeit einen Prothrombinabfall von 52-53 %, für Faktor V und Faktor VIII einen Abfall von 74% bzw. 56,3%.Als Ursache für dieses Verhalten wird einerseits eine langsam in der Blutkonserve ablaufen-

de Gerinnung(30), andererseits aber eine Aktivierung des fibrinolytischen Potentials angenommen(30,55,56,57,58,59).

In Vergleichsuntersuchungen von normalen Vollblutkonserven und solchen, denen Trasylol zugefügt worden war, konnte der Verlust an Gerinnungsfaktoren gemindert werden, ein Phänomen, das dem plasmininhibierenden Effekt des Trasylols zugeschrieben wurde.

So fanden JANDA und MACIEJEWICZ (59) bei einer Trasylolkonzentration von 5 000 KIE auf 250 ml Citratblut nach 3 Wochen Lagerzeit einen Prothrombinabfall von durchschnittlich 28% (52%), für Faktor V und Faktor VIII einen Abfall von 19% (74%) bzw.28% (56,3%) und für Fibrinogen 20% (41%). (Prozentangaben in Klammern bedeuten die Werte, die bei den Blutkonserven ohne Trasylolzusatz gefunden wurden.) Der therapeutische Wert der Blutkonserve, die ja in vielen Fällen auch eine hämostyptische Maßnahme sein kann, war bei diesem Konservierungsmodus auch nach einer Lagerzeit von 21 Tagen angeblich noch gewährleistet.

MARGGRAF (30) empfahl darüber hinaus, diese Konserven mit Trasylolzusatz auch bei Operationen zu verwenden, bei denen mit Fibrinolyseblutungen erfahrungsgemäß in einem gewissen Prozentsatz zu rechnen ist.

Nach Untersuchungen von FÜRSTENBERG (56), der einer Konserve mit 250 ml ACD-Blut 125 000 KIE Trasylol zusetzte, war in den Konserven mit dem Trasylolzusatz neben einer wesentlich geringeren Abnahme der Gerinnungsfaktoren I,II,V,VII und X eine Stabilisierung der geformten Bestandteile des Blutes festzustellen. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten sei ein membranverstärkender Effekt des Proteaseninhibitors. Durch die Enzyminhibierung konnte bei diesen Versuchen der Zellzerfall verzögert werden und eine ausreichend vollwertige Blutkonserve ohne wesentliche Zerfalls-substanzen noch 12-16 Tage über den kritischen 21. Tag hin-

aus zur Anwendung gebracht werden.

Durch die Beobachtung von schweren Blutungen nach operativen Eingriffen am Herzen unter Verwendung von Herz-Lungenmaschinen angeregt, wurden Untersuchungen am Gerinnungssystem während extrakorporaler Zirkulation durchgeführt. MAMMEN(60) konnte dabei einen deutlichen Abfall von Prothrombin, Fibrinogen und Plättchenanzahl feststellen. Der Konzentrationsabfall von Faktor V und Faktor VIII waren weniger ausgeprägt.

Ähnliche Befunde ergaben Untersuchungen von MARX und BORST (61). Die dabei festgestellten Konzentrationsverringerungen der obengenannten Gerinnungsfaktoren wurden ebenso wie von MAMMEN zumindest teilweise einer gesteigerten Fibrinolyse während der extrakorporalen Zirkulation zur Last gelegt. Durch Zugabe von Trasylol zum Bypass-Blut konnte MAMMEN anhand der Bestimmung der Euglobulinlysezeiten und im Thrombelastogramm eine deutliche Fibrinolysehemmung durch Trasylol beobachten. Dabei zeigte sich der Abfall von Prothrombin, Fibrinogen und Thrombocyten durch Trasylol unbeeinflusst. Es war aber ein deutlich geringerer Abfall von Pro-fibrinolysin und Antifibrinolysin (Plasmininhibitor) nachweisbar.

Zur Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Zur weiteren Abklärung der in früheren Arbeiten gemachten Beobachtungen über den Trasylolzusatz in Vollblutkonserven wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Trasylol

101 während einer 6-wöchigen Lagerungszeit untersucht.

Neben einer Beobachtung der geformten Bestandteile des Blutes wie der Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten wurde die Beeinflussung der Inhibitoren proteolytischer Enzyme im Plasma wie des Trypsin-Inhibitors, des Kallikrein-Inhibitors und des Plasmin-Inhibitors untersucht.

Das Auftreten freier proteolytischer Enzyme ist nach den bisherigen Ausführungen zumindest im Falle des Kallikreins und des Plasmins zu erwarten gewesen. Der Effekt ihrer Inhibierung durch den Proteinaseinhibitor Trasylol sollte auch durch die Erfassung der Substrateiweiße im Plasma wie der Fibrinogen-, der Plasminogen-, und der Kininogenfraktion untersucht werden.

Als globaler Gerinnungstest, der Veränderungen im gesamten Gerinnungspotential erfaßt, wurde deshalb die Rekalzifizierungszeit eingesetzt.

Zur Objektivierung des Zellzerfalls während der Lagerzeit wurde neben der Auszählung der geformten Bestandteile in der Zählkammer und neben der Bestimmung der osmotischen und mechanischen Resistenz der Erythrocyten, die Messung von Kalium, Hämoglobin, Glukose-6-phosphatdehydrogenase und gesamt saurer Phosphatase herangezogen, da sie intracellulär in einer sehr viel höheren Konzentration vorhanden sind als im umgebenden Plasma. Da während der Lagerung mit zunehmender Zeitdauer immer mehr Zellen zerfallen, gehen die Zellinhaltsstoffe ins umgebende Plasma über und werden dort methodisch leicht faßbar. Durch ihre in regelmäßigen Abständen erfolgende Messung sollte im Zusammenhang mit den Resistenzbestimmungen über den Erhaltungszustand der Erythrocyten zum jeweiligen Termin Aufschluß gegeben werden. Dabei sollte zusätzlich der Nachweis erbracht werden, ob bei wirksamer Proteinaseinhibierung ein stabilisierender Effekt auf die Erythrocyten nachgewiesen werden kann.

## Experimenteller Teil und Ergebnisse

### Material und Methodik

Es wurde Blut von Spendern verschiedener Blutgruppen verwendet. Die Abnahme erfolgte unter Anwendung von Vakuum in 500-ml Blutkonservenflaschen, denen bereits der ACD-Stabilisator in der üblichen Menge (Zusammensetzung des Stabilisators s. S. 5) zugefügt worden war.

Sofort nach der Abnahme vom Spender wurde den dafür vorgesehenen Konserven Trasylol in einer Dosierung von 100 bzw. 500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut zugefügt. Nach mehrmaligem vorsichtigen Wenden der Konserve zur Homogenisierung ihres Inhalts wurde das Konservenblut in jeweils 8 Portionen von etwa 65 ml in 100 ml-Konservenflaschen unter sterilen Kautelen nach dem Schwerkraftsprinzip abgefüllt. Dieses Vorgehen schützte das Konservenblut vor einer zusätzlichen mechanischen Traumatisierung, die ja in praxi nicht vorkommt, da zu den einzelnen Untersuchungsterminen eine kleine Konserve im ganzen aufgearbeitet werden konnte. Somit konnte das mehrmalige Vermischen der großen 500 ml-Konserve vermieden werden.

Es wurden Sterilitätsproben entnommen.

Bei den Konserven, die 100 KIE Trasylol/ml Konservenblut enthielten, wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt. Es wurden dabei jeweils die Eigenschaften einer "Trasylolkonserve" mit denen einer normalen Konserve verglichen. In einer 4. Versuchsreihe betrug die Trasylolkonzentration 500 KIE/ml ACD-Blut. Um bei dieser hohen Trasylolkonzentration nicht zu viel von der Aufschwemmungsflüssigkeit der Blutkonserve zu-

geben zu müssen, wurde ein hochkonzentriertes Präparat, das Trasylol K, verwendet, das 100 000 KIE in der 5 ml-Ampulle enthielt. (Die Lagerung erfolgte bei 4°C in einem speziellen Blutbankkühlschrank).

Die Beobachtungsdauer erstreckte sich auf eine 6-wöchige Lagerungszeit. Dabei wurden in festgelegten Zeitabständen (siehe Tabellen und Zeichnungen) folgende Untersuchungen durchgeführt:

im Vollblut

Erythrocytenzählung<sup>+</sup>  
Leukocytenzählung<sup>+</sup>  
Thrombocytenzählung<sup>+</sup>  
Hämoglobin  
osmotische Resistenz  
mechanische Resistenz

im Plasma

Hämoglobin  
Kalium  
Glukose-6-phosphatdehydrogenase  
gesamte saure Phosphatase  
Fibrinogen  
Plasminogen  
Rekalzifizierungszeit  
Trypsin-Inhibitor (TI)  
Kallikrein-Inhibitor (KI)  
Plasmin-Inhibitor  
Kininogen  
Kininasen  
unspez. Esterase  
a) im Nativplasma  
b) im rekalzifizierten Plasma

<sup>+</sup> Diese Untersuchungen wurden nur in der 4. Versuchsreihe durchgeführt.

Vorweggenommen seien die Definierungen der im folgenden Teil verwendeten Einheiten:

#### Kallikrein-Einheit (KE)

1 KE ist die Kallikreinmenge, die bei i.v.-Injektion an der Karotisdruckkurve eines Hundes dieselbe Senkung hervorruft wie 5 ml Menschenharn, die einer Sammelprobe von 50 l entnommen wurden und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert wurden.

#### Kallikrein-Inhibitor-Einheit (KIE)

1 KIE ist die Menge an Kallikreininhibitor, die nach 2- stündiger Inkubation bei pH=8,0 und Raumtemperatur 2 KE, gemessen am Blutdruck, zur Hälfte inaktiviert.

#### Trypsin-Inhibitor-Einheit (TIE)

Die früher gewählte TIE ist die Inhibitormenge, die unter definierten Bedingungen die Aktivität von 1  $\mu$ g kristallisiertem Trypsin zu 50% hemmt.

#### Intern.Enzym-Einheit (E)

1 E katalysiert bei 25°C die Umsetzung von 1  $\mu$ Mol Substrat pro Minute. Der 1/1000. Teil dieser Aktivität ist 1 Milli-Einheit (1 mE).

#### Intern.Inhibitor-Einheit (IE)

1 IE ist die Inhibitormenge, welche die Aktivität einer E hemmt bzw. den Substratumsatz um 1  $\mu$ Mol pro Minute reduziert. Der 1/1000. Teil dieser Inhibitormenge ist 1 Inhibitor-Milli-Einheit ( 1 ImE ).

### 1. Erythrocytenzählung

Abnahme von Konservenblut mit der Erythrocytenpipette, Vermischen mit Hayem'scher Lösung im Verhältnis 1:100, Auszählung in der Zählkammer nach THOMA u. ZEISS.

### 2. Leukocytenzählung

Abnahme von Konservenblut mit der Leukocytenpipette, Vermischen mit 3%-iger Essigsäure im Verhältnis 1:10, Auszählung in der Zählkammer nach THOMA u. ZEISS.

### 3. Thrombocytenzählung (n. FEISLY u. LÜDIN)

Abnahme von Konservenblut mit einer Erythrocytenpipette, Vermischen mit 2%-iger Novocain-HCl-Lösung im Verhältnis 1:1000, Auszählung mit Phasenkontrastmikroskop in der Kammer nach NEUBAUER.

### 4. Hämoglobinbestimmung

Unter der Einwirkung einer Transformationslösung erfolgt eine quantitative Umsetzung des Hämoglobins in Hämiglobincyanid. Dieser stabile und über längere Zeit messbare Farbstoff wurde durch Messung seiner Extinktion am Photometer bestimmt (u. Benützung der fertigen Testansätze der Fa. Asid-Institut München-Lohhof).

### 5. Osmotische Resistenz

Der Zusatz von Erythrocyten zu einer fallenden Reihe hypotoner Kochsalzlösungen führt zu einer steigenden Hämolyse. Der Hämolysegrad der durch Wasseraufnahme geplatzten Erythrocyten wurde anhand des ausgetretenen Hämoglobins ermittelt.

Durchführung:

Herstellung einer Verdünnungsreihe hypotoner Kochsalzlö-

sungen beginnend von 0,76%NaCl bis hin zu 0,13% NaCl, jeweils Vermischen mit 0,02 ml Konservenblut, Zentrifugieren des Röhrcheninhalts bei 3 500 U/min., Vermischen von 0,2 ml des Überstands mit 5 ml der Transformationslösung. Bestimmung des Hämolysegrads am Photometer.

## 6.Mechanische Resistenz

Durch mechanische Traumatisierung von Erythrocyten (mit kleinen Glaskugeln) tritt Hämoglobin aus den Zellen aus.

Durchführung:

Durchschütteln von 2 ml Konservenblut in einem 25 ml ERLLENMEYER- Kolben zusammen mit 20 Glasperlen von 4 mm Durchmesser (1 Stunde, 120 Schübe/min., 37°C.), Zentrifugieren (3 000 U/min., 10 min.) des mechanisch belasteten Blutes und der gleichen Menge frisch aus der Konserve entnommenen Blutes, Hämoglobinbestimmung im Überstand (0,02 ml des Überstands mit 5 ml Transformationslösung vermischen). Berechnung: (mech.Resistenz in % Hämolyse)

$$\% \text{ Hämolyse} = \frac{\text{mech.belastete Probe } (\Delta E) \times 100 - \text{unbel.Pr.} (\Delta E)}{(\Delta E) \text{ HB-Gehalt des ACD-Vollblus}}$$

## 7.Hämoglobin im Plasma

Vermischen von 0,2 ml Plasma und 5 ml der Transformationslösung, optische Bestimmung am Photometer.

## 8.Kalium im Plasma

Einer Propangasflamme wird Plasma in zerstäubter Form zugeführt. Aus dem ausgesandten Licht werden durch Interferenzfilter die Fremddlinien ausgeblendet und die Strahlungsintensität der zu bestimmenden K-Linie (766,769 nm) ermittelt (Plasmaverdünnung 1:20).

## 9.Glukose-6-phosphatdehydrogenase (Glu-6-PDH)

Die Glu-6-PDH katalysiert die Reaktion:



Als Coenzym ist in den Test das Triphosphopyridinnukleotid eingesetzt, das unter einer im enzymatisch-optischen Test am Photometer erfaßbaren Extinktionszunahme zu  $\text{TPNH} + \text{H}^+$  reduziert wird (u.Benützung der fertigen Testansätze der Fa.Boehringer, Mannheim).

#### 10. Gesamte saure Phosphatase im Plasma

Als Substrat für die Messung der sauren Phosphatase im Plasma dient das Natrium-p-nitrophenylphosphat. Die Aktivität der sauren Phosphatase wird nach einer Reaktionszeit von 30 min. durch Zugabe von Natronlauge zum Ansatz total gehemmt. Aus dem freigesetzten p-Nitrophenol entsteht das gelbe Anion, das photometriert wird und dessen freigesetzte Menge der Phosphatasenaktivität im Plasma direkt proportional ist (u. Benützung der fertigen Testansätze der Fa. Boehringer, Mannheim).

#### 11. Rekalzifizierungszeit (n. HOWELL)

Im ACD-Konservenblut sind die für die Gerinnung notwendigen Kalzium-Ionen durch Natriumzitrat gebunden. Durch Zugabe von Kalziumionen im Überschuß wird eine Gerinnung ausgelöst.

Durchführung:

0,5 ml ACD-Blut werden nach 1 min. Vorwärmen bei  $47^{\circ}\text{C}$  mit 0,5 ml vorgewärmtem  $\text{CaCl}_2$  m/40 versetzt und die Stoppuhr gedrückt. Durch Kippen des Röhrchens in regelmäßigen Zeitabständen wird der Beginn der Gerinnung festgestellt und abgestoppt.

#### 12. Fibrinogen im Plasma

0,2 ml des Konservenplasmas werden mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mit einem ml m/40  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zur Gerinnung gebracht. Das so gewonnene Fibringerinnsel wird mit 2n NaOH-Lösung aufgelöst und reagiert mit dem Kupfersalz einer Biuretlösung unter violetter Verfärbung, deren Intensität durch Extinktionszunahme am Photometer quantitativ erfaßt wird (u. Anwendung der Testkombination der Fa. Schweizerhall, Lörrach).

#### 13. Kallikrein-Inhibitor im Plasma (n. TRAUTSCHOLD und WERLE (62))

Grundlage für die in vitro-Bestimmungen von Kallikrein und Kallikreininhibitor ist die esterolytische Aktivität der Kallikreine, die der kininbildenden Kapazität parallel geht. Als Substrat für die Esterspaltung dient der Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE). Neben den Kallikreinen ist auch Plasmin zur BAEE-Spaltung befähigt. Zur Bestimmung der Inhibitorkapazität wird das Enzym im allgemeinen zuerst mit dem Inhibitor 5-10 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und die verbleibende Enzymak-

tivität durch Zugabe des jeweiligen Substrats bestimmt. Parallel dazu mißt man die Aktivität der gleichen, nicht gehemmten Enzymmenge. Wichtig, noch zu erwähnen, daß bei der Messung von Hydrolase-Inhibitoren nur bis zu einem Grenzwert eine streng lineare Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Inhibitorkonzentration besteht. Deshalb soll die restliche Enzymmenge nicht weniger als 50% betragen.

Kallikrein katalysiert die Reaktion:



Das mit der Spaltung von BAEE freigesetzte Äthanol wird im enzymatisch-optischen Test mit ADH und TPN<sup>+</sup> analysiert.

Bei den Bestimmungen im Konservenplasma mit dem Zusatz von 100 KIE Trasylol / ml ACD-Blut wurde Trasylol aus dem Plasma vorher entfernt. (Einrühren von 2 Spatelspitzen des trockenen Austausches XE 64 in 1 ml Plasma, Verdünnung mit 4 ml a.dest., Zentrifugierung.)

#### Reagentien:

TRA-HCl-Puffer (pH 7,8)

Pyrophosphat -semicarbacid-glycin-Puffer (pH 8,7)

NAD-Lösung (20 mg NAD/ml a.bidest.)

BAEE-Lösung (2,0 mg BAEE·HCl/ ml aqu.bidest.)

ADH-Lösung (30 mg Enzymprotein/ml a.bidest.)

Kallikrein-Standardlösung (Padutin<sup>®</sup>, Bayer, 10 KE/ml )

#### Ansätze:

|                                                           |         |
|-----------------------------------------------------------|---------|
| a. Kallikrein Standardlösung                              | 0,20 ml |
| TRA-HCl-Puffer                                            | 1,80 ml |
| b. Kallikrein Standardlösung                              | 0,20 ml |
| Konservenplasma der                                       |         |
| aa. ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz                     | 0,20 ml |
| bb. ACD-Konserven mit Trasylolzusatz                      |         |
| (nach Entfernung des Trasylols mit dem Austauscher XE 64) | 0,20 ml |
| TRA-HCl-Puffer                                            | 1,60 ml |
| c. Konservenplasma                                        | 0,20 ml |
| TRA-HCl-Puffer                                            | 1,80 ml |

Die Ansätze (a., b., c.,) bei 25°C 10 min. inkubieren, 0,1 ml davon in den weiteren Test einsetzen.

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| NAD-Lösung                              | 0,10 ml |
| Pyrophosphat-semicarbacid-glycin-Puffer | 2,28 ml |
| ADH-Lösung                              | 0,02 ml |
| Ansatz a., b., oder c.                  | 0,10 ml |

Inkubation der Ansätze 10 min. bei 25°C, anschließend

Starten der Reaktion mit 0,5 ml BAEE-Lösung. Nach 3 Minuten Ablesen des Ausgangswertes der Extinktion. Meßzeit 10 min., Schichtdicke 1 cm, Meßvolumen 3 ml, Meßtemperatur 25°C, Meßstrahlung 366 nm.

Im Ansatz c. wird der Wert für die unspezifische estero-lytische Kapazität des Plasmas erfaßt und muß bei der Berechnung berücksichtigt werden.

Für die Berechnung gilt:

Die Extinktionsänderung von 0,0011  $\Delta E/\text{min.}$  entspricht 1 mE Kallikrein oder dem Umsatz von 1  $\mu\text{M}$  Mol Substrat/min. bei einem Küvettenvolumen von 3 ml.

#### 14. Plasmin-Inhibitor im Plasma

Grundlage für die in vitro-Bestimmung des Plasmininhibitors ist die esterolytische Aktivität von Plasmin. Als Substrat für die Esterspaltung dient ebenso wie für die Kallikreinbestimmung der Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE) als Substrat. Das mit der Spaltung von BAEE freigesetzte Äthanol wird im enzymatisch-optischen Test mit ADH und TPN<sup>+</sup> analysiert.

Reagentien:

Plasmin-NOVO (0,5 E/ml)

weitere Reagentien wie bei der Bestimmung des Kallikrein-inhibitors

Ansätze:

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| a. TRA-HCl-Puffer                      | 4,50 ml |
| Plasmin-Standardlösung                 | 0,50 ml |
| b. TRA-HCl-Puffer                      | 4,30 ml |
| Konservenplasma der                    |         |
| aa. ACD-Konserve ohne Trasylolzusatz   | 0,20 ml |
| bb. ACD-Konserve mit Trasylolzusatz    |         |
| (nach Entfernung des Trasylols mit dem |         |
| Austauscher XE 64)                     | 0,20 ml |
| Plasmin-Standardlösung                 | 0,50 ml |
| c. TRA-HCl-Puffer                      | 4,80 ml |
| Konservenplasma                        | 0,20 ml |

Inkubation der Ansätze (a., b., c.) bei 25°C 10 Minuten, Einsetzen in den weiteren Test davon 0,20 ml.

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| NAD-Lösung                                | 0,10 ml |
| Pyrophosphatsemicarbonsäure-glycin-Puffer | 2,20 ml |
| Ansatz a., b., oder c.                    | 0,20 ml |

Weitere Durchführung wie die Bestimmung des Kallikrein-Inhibitors.

## 15. Esterasen

Die Bestimmung der Esteraseaktivität wurde im Plasma und im Serum (n.Rekalzifizierung des Plasmas mit  $m/40$   $CaCl_2$ -Lösung im Mischungsverhältnis 1:1) durchgeführt.

Als Substrat der Testreaktion diente ebenfalls BAEE, dessen Spaltung in Benzoyl-l-arginin und Äthanol mit ADH und TPN<sup>+</sup> im enzymatisch-optischen Test analysiert wird.

Ansätze:

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| a. Pyrophosphat-semicarbacid-glycin-Puffer | 2,33 ml |
| NAD-Lösung                                 | 0,10 ml |
| ADH-Lösung                                 | 0,02 ml |
| Konserven-Plasma                           | 0,05 ml |
| b. Pyrophosphat-semicarbacid-glycin-Puffer | 2,28 ml |
| NAD-Lösung                                 | 0,10 ml |
| ADH-Lösung                                 | 0,02 ml |
| Serum                                      | 0,10 ml |

Inkubation der Ansätze bei 25°C 10 Minuten, Starten der Reaktion mit 0,5 ml BAEE-Lösung, nach 3 Minuten Ablesen des Ausgangswertes der Extinktion. Meßzeit 10 min., Schichtdicke 1 cm, Meßvolumen 3 ml, Meßtemperatur 25°C, Meßstrahlung 366 nm.

## 16. Trypsininhibitor im Plasma

Grundlage für in vitro-Bestimmungen von Trypsin und Trypsininhibitor ist die Spaltung von Benzoyl-l-arginin-p-nitroanilid (BAPA) in Benzoyl-l-arginin und p-Nitroanilin durch Trypsin. Die durch die Freisetzung von p-Nitroanilin bedingte Extinktionszunahme kann im Photometer abgelesen werden.

Bei den Konserven mit 500 KIE Trasylol/ml wurde zuerst der gesamte Inhibitorgehalt des Plasmas gemessen, dann das Plasma enteiweißt (mit 6%-iger Perchlorsäure im Mischungsverhältnis 1:1) und die im Überstand vorhandene Trasylol-konzentration anhand der Trypsinhemmung ermittelt. Die Differenz der so gefundenen Werte ergab die Konzentration des Plasmatrypsininhibitors.

Ansätze:

|                                                           |         |
|-----------------------------------------------------------|---------|
| a. TRA-HCl Puffer                                         | 1,90 ml |
| Trypsin-Standardlösung                                    | 0,10 ml |
| (Trypure <sup>R</sup> NOVO 5 x 10 <sup>-6</sup> g/0,1 ml) |         |
| b. TRA-HCl Puffer                                         | 1,70 ml |
| Trypsin-Standardlösung                                    | 0,10 ml |
| Konservenplasma der                                       |         |
| aa. ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz                     | 0,20 ml |
| bb. ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml                 | 0,20 ml |

- cc. ACD-Konserven mit Zusatz von 100 KIE  
Trasylol/ml (nach Entfernung von T.  
durch XE 64: s.S.35) 0,20 ml
- dd. ACD-Konserven mit Zusatz von 500 KIE  
Trasylol/ml (Plasma mit aqu.bidest.  
1:100 verdünnt) 0,20 ml
- ee. ACD-Konserven mit Zusatz von 500 KIE  
Trasylol/ml (Plasma mit Perchlorsäure  
enteiweißt, Überstand 1:100 verdünnt) 0,20 ml

Starten der Reaktion mit 1,00 ml BAPA-Lösung, Ablesen des Ausgangswertes der Extinktion nach 3 Minuten. Meßzeit 5 min., Meßvolumen 3 ml, Meßtemperatur 25°C, Meßstrahlung 405 nm, Schichtdicke 1 cm.

Für die Berechnung gilt: 1 ImE Trypsininhibitor verringert den Substratumsatz (BAPA) von Trypsin um 0,00332  $\Delta E/min.$  im 3 ml Testansatz.

## 17. Plasminogen

Zur Plasminogenbestimmung wurde Plasminogen durch einen Überschuß an Streptokinase zu Plasmin aktiviert und dann anhand seiner esterolytischen Aktivität in bekannter Weise gemessen. Als Substrat diente Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE). (s. Bestimmung des Plasmininhibitors im Plasma S.36 Abs.14.)

Ansätze:

- Pyrophosphat-semicarbacid-glycin-Puffer 2,36 ml
- NAD-Lösung 0,10 ml
- ADH-Lösung 0,02 ml
- Konservenplasma (Vorinkubation von 1 ml  
Plasma mit 1000 E = 0,1 ml Streptokinase  
(Fa. Lederle)) der
- a. ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz 0,02 ml
- b. ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml  
(nach Entfernung des Trasylols mit dem  
Austauscher XE 64) 0,02 ml

Inkubation der Ansätze bei 25°C 5 min., Starten der Reaktion mit 0,5 ml der BAEE-Lösung, Ablesen des Ausgangswertes der Extinktion nach 3 min. Meßzeit 5-10 min., Meßstrahlung 366 nm, Meßvolumen 3 ml, Meßtemperatur 25°C Schichtdicke 1 cm.

Berechnung wie bei der Bestimmung des Kallikreininhibitors.

## 18. Kininogen im Plasma

Plasmakininogen wird durch einen Überschuß an Trypsin zu Plasmakinin (Bradykinin) aktiviert. Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt bei pH 7,5. Um den vorzeitigen Abbau

der freigelegten Kinine zu verhindern, müssen die Kininasen im Plasma inaktiviert werden (Ansäuern des Plasmas mit 0,2 n Essigsäure und anschließendes Erhitzen bei 100°). Die Bestimmung der Aktivität der freigelegten Kinine erfolgt gegen einen Kininstandard am isolierten Rattenuterus.

Bei den Blutkonserven mit Trasylolzusatz mußte zur Kininfreilegung eine entsprechend höhere Trypsinkonzentration gewählt werden.

#### Ansätze:

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| Essigsäure (0,2 n)                      | 1,80 ml |
| Konservenplasma der                     |         |
| a.ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz     | 0,20 ml |
| b.ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml | 0,20 ml |
| c.ACD-Konserven mit 500 KIE Trasylol/ml | 0,20 ml |

Inkubation bei 100°C 30 Minuten, Abkühlen im Eisbad, Zugabe von 0,01 ml Thioglykolsäure(80%-ig), Einstellen des pH-Wertes der einzelnen Ansätze auf pH 7,5. Starten der Reaktion mit 200  $\mu$ g Trypsin. (bei d.Konserve mit 500 KIE T./ml Einsetzen von 1 000  $\mu$ g Trypsin) Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten (bei 25°C) Abstoppen der Reaktion durch Inhibierung des Trypsins mit Trasylol in einer Menge von 1000 KIE pro Ansatz (im Ansatz der Blutkonserve mit 500 KIE Trasylol/ml Inhibierung mit 4000 KIE Trasylol).

Bei der anschließenden Austestung am isolierten Rattenuterus durch Hubhöhenvergleich einer standardisierten Kininmenge gegenüber (Kallidinstandard) Verwendung von 0,1 - 0,3 Kallikreineinheiten (etwa 0,1 - 0,3 ml der jeweiligen Ansätze).

### 19. Kininasen im Plasma

Das kininasenhaltige Plasma wurde mit einer standardisierten Kininmenge vorinkubiert. Der Abbau der Kinine durch die Kininasen des Plasmas erfolgt sehr rasch, wodurch sich die am isolierten Rattenuterus beobachtete Hubhöhe verringert. Die in der Zeiteinheit verringerte Hubhöhe wieder wie bei der Bestimmung der Kininogenkonzentration im Plasma gegen die durch einen Kininstandard erreichte Hubhöhe verglichen - dient als Meßgröße der Kininaseaktivität.

#### Ansätze:

|                                         |            |
|-----------------------------------------|------------|
| TRA-HCl-Puffer                          | 0,8-0,9 ml |
| Konservenplasma der                     |            |
| a.ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz     | 1,0 ml     |
| b.ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml | 1,0 ml     |
| c.ACD-Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml  | 1,0 ml     |

Starten der Reaktion durch Zugabe von 0,1-0,2 KE des

Kallidinstandards, möglichst kurz hintereinander erfolgende Probeentnahme aus den einzelnen Ansätzen, Beobachten der Reaktion bis zu einem 50%-igen Abbau der vorgelegten Kininmenge.

Für die Berechnung gilt:

$1 \mu\text{Mol Kallidin} \pm 1\,073,46 \mu\text{g Kallidin}$

0,1 ml Standard-Kallidin (0,1 KE) enthalten 0,75  $\mu\text{g Kallidin}$ .

## Ergebnisse der Bestimmungen im Vollblut

### 1. Resistenz der Erythrocyten

#### a. osmotische Resistenz

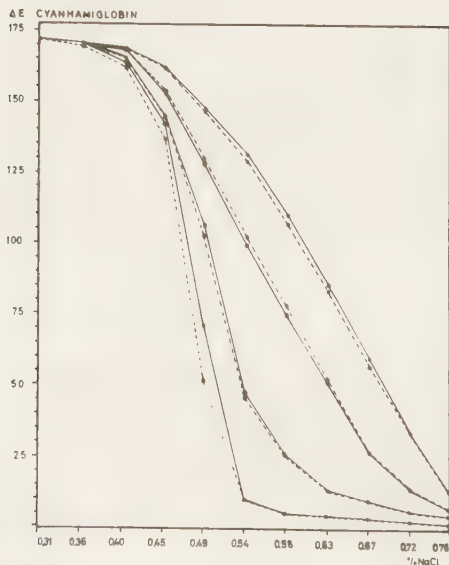


Abb.1 Osmotische Resistenz der Erythrocyten (— Konserven ohne Trasylol — — — Konserven mit 100 bzw. 500 KIE Trasylol/ml). Abnahme der osmotischen Resistenz während der Lagerung (Doppelkurven (v.l.n.r.) vom 1., 15., 29. u. 43. Tag der Lagerung)

Die Abbildung 1 zeigt in Summationskurven aus 4 Untersuchungsreihen das Verhalten der osmotischen Resistenz der Erythrocyten während der 6-wöchigen Lagerung. Bei frischem Konservenblut (1 Tag alt) war bei einer Kochsalzkonzentration von 0,54 - 0,49% NaCl (Normwert bei 0,48 - 0,45% NaCl) eine beginnende Hämolyse zu verzeichnen. Die vollständige Hämolyse trat bei 0,40 - 0,36% NaCl (Normwert 0,33 - 0,28% NaCl) ein.

Bei zunehmendem Alter der Konserve war eine deutliche Rechtsverschiebung der Resistenzkurven sichtbar, die bei der Bestimmung am 29. Lagerungstag am deutlichsten hervortrat. Sie betraf vor allem die Werte für die beginnende Hämolyse.

Bei den Blutkonserven, denen zusätzlich zum üblichen Stabilisator 100 KIE bzw. 500 KIE Trasytol/ml zugesetzt worden war, konnte im Verlauf der Lagerung kein Effekt auf die osmotische Resistenz nachgewiesen werden.

#### b. mechanische Resistenz

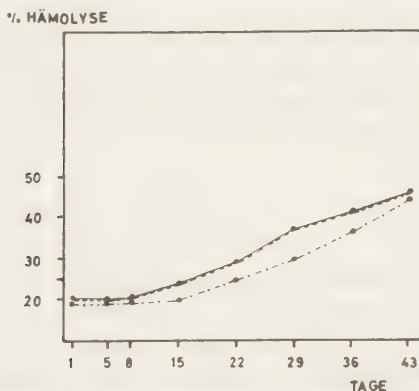


Abb.2 Mechanische Resistenz der Erythrocyten(— ACD-Konserven ohne Trasytolzusatz, --- mit Zusatz von 100 KIE/ml ACD-Konservenblut, .... mit 500 KIE/ml ACD-Konservenblut

Die Abbildung zeigt in Summationskurven aus 4 Untersuchungsreihen das Verhalten der mechanischen Resistenz der Erythrocyten während einer 6-wöchigen Lagerungszeit.

Die mechanische Resistenz nahm in diesem Zeitraum um 26% ihres nach 1 Lagerungstag ermittelten Ausgangswertes ab.

Die Konserven mit einem Trasylolzusatz von 100 KIE/ml zeigten das gleiche Verhalten bezüglich der mechanischen Resistenz wie die Vergleichskonserven.

Demgegenüber konnte mit einem Zusatz von 500 KIE Trasylol im ml ACD-Blut bis zum 15. Lagerungstag der Anstieg der Hämolyse nach mechanischer Belastung des Blutes unterdrückt werden. Nach diesem Zeitpunkt war ebenfalls eine zunehmende Hämolyse zu beobachten. Nach 43 Tagen wies die mechanische Resistenz in allen Konserven annähernd die gleichen Werte auf.

## 2. Hämoglobingehalt des Vollbluts

Der mittlere Hämoglobingehalt der einzelnen Blutkonserven und der daraus entnommenen Proben betrug 13 g% HB. Dieser Wert blieb in jeder Konserve während der gesamten Lagerungszeit konstant.

## 3. Zählung der geformten Bestandteile des Blutes

Die Zählung der Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten erfolgte in der letzten Versuchsreihe, bei der die "Trasylolkonserve" 500 KIE Trasylol/ml ACD- Blut enthielt.

Tabelle I

| Lagerzeit | Erythrocyten            |              | Leukocyten              |              | Thrombocyten            |          |
|-----------|-------------------------|--------------|-------------------------|--------------|-------------------------|----------|
|           | ACD-Blut+<br>500 KIE/ml | ACD-<br>Blut | ACD-Blut+<br>500 KIE/ml | ACD-<br>Blut | ACD-Blut+<br>500 KIE/ml | ACD-Blut |
| 1 Tag     | 3,62                    | 3,95         | 4800                    | 4980         | 160 000                 | 165 000  |
| 5 Tage    | 3,46                    | 3,94         | 2580                    | 2830         | 150 000                 | 154 000  |
| 8 Tage    | 3,76                    | 3,87         | 2080                    | 1600         | 95 000                  | 78 000   |
| 15 Tage   | 3,96                    | 3,96         | 1480                    | 1430         | 76 000                  | 62 000   |
| 22 Tage   | 3,73                    | 3,66         | 1250                    | 1190         | 59 000                  | 41 000   |
| 29 Tage   | 3,89                    | 3,79         | 1050                    | 980          | 41 000                  | 34 000   |
| 36 Tage   | 3,81                    | 3,86         | 980                     | 870          | 24 000                  | 22 000   |
| 43 Tage   | 3,78                    | 4,01         | 860                     | 790          | 15 000                  | 11 000   |

In Tabelle I sind die Werte für Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten/cmm im Verlauf der 43-tägigen Lagerzeit zusammenfassend dargestellt.

Die gegenüber der Norm von Anfang an verminderte Anzahl der Erythrocyten ist durch die Verdünnung mit dem ACD-Stabilisator bedingt.

Der Zerfall der Erythrocyten war im Verlauf der Lagerung nicht so groß, als daß er mit den üblichen Bestimmungsmethoden hätte erfaßt werden können.

Wie die Tabelle weiter zeigt, nahmen in den ersten Tagen der Lagerung die Leukocyten um über die Hälfte ihrer ursprünglichen Zellzahl ab. Dieser Leukocytensturz in den ersten 5 Lagerungstagen konnte durch den Trasylolzusatz nicht abgefangen werden. Der weitere Zerfall schritt langsamer voran. Am 43. Lagerungstag waren praktisch keine Leukocyten mehr vorhanden. Die Anzahl der Thrombocyten lag bereits nach 1 Tag der Lagerung unter der Normgrenze, auch wenn man die Verdünnung mit

dem ACD-Stabilisator berücksichtigt. Der weitere Zerfall der Thrombocyten war vorallem in den ersten Tagen besonders groß. Vom 8. Lagerungstag an lag die Zahl der Thrombocyten in der "Trasylolkonserve" konstant über der der Vergleichskonserve. Der rapide Thrombocytenzerfall der ersten 8 Tage konnte allerdings nicht entscheidend beeinflußt werden.

## Ergebnisse der Bestimmungen im Plasma

### 1. Kalium

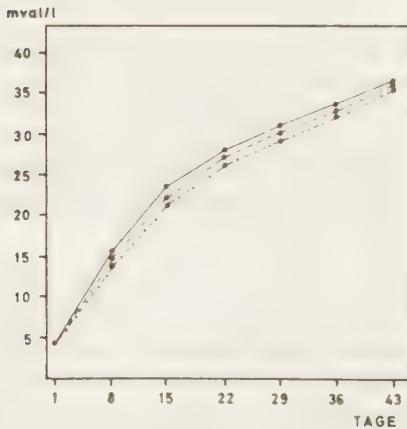


Abb. 3 Kaliumkonzentration im Konservenplasma. (— Plasma der ACD-Konserven, --- Plasma ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml, -.-.- Plasma der ACD-Konserven mit 500 KIE Trasylol/ml).

Wie die Abbildung zeigt, erfolgte der Austritt intracellulären Kaliums in den ersten 3 Lagerungswochen besonders rasch. Die Kaliumkonzentration des Plasmas stieg in dieser Zeit bei den ACD-Konserven von 4,95 auf 29 mval/l und erreichte nach 43 Tagen einen Wert von 37,0 mval/l.

Die Blutkonserven, die 100 KIE Trasylol/ml enthielten, verhielten sich bezüglich der Kaliumanhäufung im Plasma ähnlich den Vergleichskonserven, wiesen aber geringfügig niedrigere Werte auf.

Die Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml erbrachte keine neuen Gesichtspunkte. Auch mit dieser hohen Trasylolkonzentration konnte der Kaliumaustritt nicht verzögert werden.

## 2. Hämoglobin im Plasma

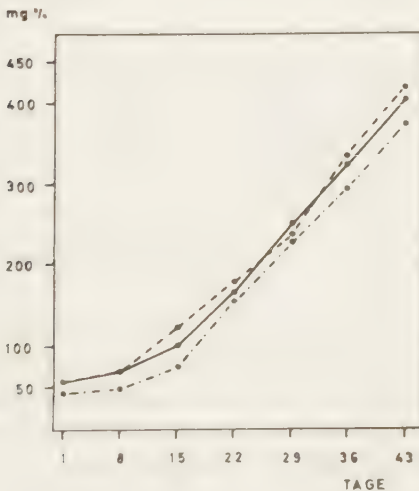


Abb. 4 Hämoglobinkonzentration im Konservenplasma. (— Plasma der ACD-Konserven, --- Plasma der ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml, -.-.- Plasma der ACD-Konserven mit 500 KIE Trasylol/ml).

Während der Lagerung war ein kontinuierlicher Hämoglobinaustritt aus den Erythrocyten zu beobachten, der vom 15. Lagerungstag an besonders deutlich wurde. Nach 6 Wochen war ein Wert von 410 mg % bei den Konserven ohne bzw. von 420 mg % bei den ACD-Konserven mit 100 KIE Trasylol erreicht. Es traten also nur etwa 3% des Hämoglobins in den Erythrocyten nach 6 Wochen ins umgebende Plasma aus.

Der Zusatz von 100 KIE Trasylol/ml ACD-Blut konnte diesen Vorgang nicht unterdrücken.

Nach 15 Tagen lag die Hämoglobinkonzentration im Plasma der Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml erst so hoch wie in den übrigen Konserven bereits nach 7 Tagen. Aber auch in dieser Konserve stieg das Hämoglobin nach diesem Zeitpunkt sehr rasch an und lag am Ende der Lagerfrist nur geringfügig unter den Werten, die bei den übrigen Konserven gefunden wurden.

### 3. Gesamte saure Phosphatase

Der Gehalt der Erythrocyten an saurer Phosphatase liegt bei 2,9 E Pro g Erythrocyten, das entspricht 1300 mE/ml Vollblut.

Die Normwerte für die Aktivität an saurer Phosphatase im Plasma werden mit bis zu 11 mE/ml Plasma angegeben.

Beim Zerfall der Erythrocyten in der lagernden Blutkonserve war also ein Ansteigen der Phosphataseaktivität im Konservenplasma anzunehmen und im Falle einer stabilisierenden Wirkung von Trasylol auf die Erythrocyten ein geringeres Ansteigen derselben.

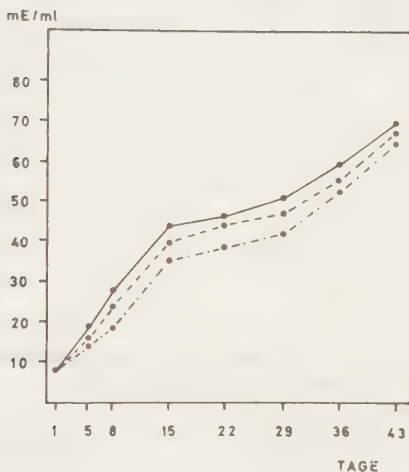


Abb.5 Aktivität der gesamten sauren Phosphatase im Konservenplasma.  
 (— Plasma der ACD-Konserven,  
 --- Plasma der ACD-Konserven mit 100  
 KIE Trasylol/ml, ---- Plasma der ACD-  
 Konserven mit 500 KIE Trasylol/ml.

Wie Abbildung 5 (in Summationskurven) zeigt, erfolgte der Anstieg der sauren Phosphataseaktivität in den ersten 14 Tagen besonders rasch. Der Grund für dieses Verhalten liegt nicht in einem erhöhten Erythrocytenzerfall während dieser Zeit, da, wie Abbildung 4 zeigt, in den ersten 14 Tagen das Hämoglobin nur sehr langsam ansteigt, sondern muß am Vorhandensein einer anderen Quelle für die saure Phosphatase liegen. Wenn man berücksichtigt, daß die Leukocyten in den ersten 8 Tagen besonders rasch zerfallen, liegt es nahe,

daß der rasche Anstieg der Phosphataseaktivität in den ersten 14 Tagen durch die saure Leukocytenphosphatase verursacht wird, zumal dieses Enzym eine lange Halbwertszeit besitzt.

#### 4. Glukose-6-phosphatdehydrogenase (Glu-6-PDH)

Tabelle II

| Glukose-6-phosphatdehydrogenase mE/ml Plasma |          |                         |                         |
|----------------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| Lagerzeit                                    | ACD-Blut | ACD-Blut+<br>100 KIE/ml | ACD-Blut+<br>500 KIE/ml |
| 1 Tag                                        | 0,85     | 0,69                    | 0,70                    |
| 5 Tage                                       | 5,60     |                         | 3,58                    |
| 8 Tage                                       | 7,27     | 6,21                    | 5,67                    |
| 15 Tage                                      | 7,50     | 6,25                    | 5,95                    |
| 22 Tage                                      | 7,70     | 6,90                    | 5,15                    |
| 29 Tage                                      | 5,74     | 4,35                    | 4,88                    |
| 43 Tage                                      | 1,37     | 1,25                    | 1,27                    |

Die Glukose-6-phosphatdehydrogenase (Glu-6-PDH) ist unter normalen Bedingungen im Serum nicht nachweisbar, während ihre Aktivität in den Erythrocyten einen Wert von 120-240 mE/10<sup>9</sup> Zellen aufweist.

Dieses von WARBURG 1931 entdeckte Enzym weist also gegen-

über dem Serum in den Erythrocyten eine hohe Konzentration auf und wird bei der Glukose-6-Phosphatoxydation zu 6-Phosphoglukonolakton unter Beteiligung des Triphosphopyridinnukleotids ( $\text{TPN}^+$ ) als Coenzym in den Erythrocyten verbraucht (nicht glykolytischer Stoffwechsel der Glukose in den Erythrocyten s.S.7).

Gehen die Erythrocyten aber vorzeitig zugrunde, so kann es im Konservenplasma nachgewiesen werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte das Enzym bereits nach 1 Tag Lagerung in geringen Mengen nachgewiesen werden, was als Beweis dafür anzusehen ist, daß das Blut durch die Abnahmepraktiken und die Lagerung in Glasflaschen doch erheblich traumatisiert wird. Die Enzymaktivität stieg dann in den folgenden Lagerungswochen kontinuierlich an, um in der 3. Woche das Aktivitätsmaximum zu erreichen, das in den Konserven ohne Trasylolzusatz etwa das  $9^{1/2}$ -fache der Ausgangsaktivität betrug.

Nach diesem Zeitpunkt war ein Rückgang der Enzymaktivität zu verzeichnen. Dieser Rückgang trat nicht unerwartet ein, da ja bekannt ist, daß die Glu-6-PDH einen im Vergleich zu anderen Enzymen im Erythrocyten schnellen Aktivitätsverlust erleidet und offensichtlich ab der 4. Lagerungswoche Erythrocyten zerfallen, deren Gehalt an Glu-6-PDH bereits erheblich vermindert ist.

Einen gut erfaßbaren Unterschied zu den ACD-Konserven zeigten die Konserven, die zusätzlich 100 bzw. 500 KIE Trasylol/ml enthielten. In diesen Konserven war die Enzymkonzentration im Plasma deutlich niedriger, wobei zwischen den Konserven mit 100 und der mit 500 KIE/ml kein wesentlicher Unterschied bestand.

## 5. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Wenn man die Untersuchungsergebnisse, die bisher vorallem das Verhalten der Erythrocyten in den einzelnen Konservenarten aufzeigen sollten, betrachtet, so steht eine in allen Konserven nach der 2. Lagerungswoche rasch zunehmende Hämolyse im Vordergrund, die auch aus einer sich vermindernenden mechanischen und osmotischen Resistenz abgelesen werden konnte. Der Erythrocytenzerfall war allerdings auch nach 6 Wochen nicht so groß, als daß er mit der Zählkammermethode hätte erfaßt werden können.

Bei den Leukocyten und den Thrombocyten war der Zellzerfall in der 1. Woche am größten.

Durch diese bereits vom 1. Tag an zu beobachtende Hämolyse gelangten Zellinhaltsstoffe ins Plasma und konnten dort in steigender Konzentration nachgewiesen werden.

An erster Stelle seien hier das Kalium und das Hämoglobin genannt, die nach 43 Tagen Werte aufwiesen, die das 7-8-fache der Ausgangswerte betrugen, wobei Kalium auch schon in den ersten Tagen sehr rasch anstieg.

Als weiteres Zeichen zunehmender Hämolyse kann das Ansteigen der Aktivitäten von Glukose-6-PDH und der gesamten saueren Phosphatase im Plasma angesehen werden.

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, daß durch die Zugabe von Trasylol zu Vollblutkonserven keine wesentliche Stabilisierung der Erythrocyten erreicht werden kann. Wohl lagen bei einzelnen Untersuchungen die Werte für die "Trasylolkonserven" günstiger als bei den Vergleichskonserven, ohne aber das Ausmaß zu erreichen, das eine wesentliche Verbesserung der bisherigen Konservierungsmethode bedeutet hätte.

## 6. Trypsin-Inhibitor

Der durchschnittliche Trypsininhibitorgehalt des Konservenplasmas bei den Blutkonserven ohne Trasylolzusatz betrug 994 ImE/ml.

Dieser Wert blieb über die 43-tägige Lagerzeit hinweg konstant erhalten.

Tabelle III

| Trypsininhibitor ImE/Plasma |          |                          |                                           |
|-----------------------------|----------|--------------------------|-------------------------------------------|
| Lagerzeit                   | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml<br>Tras.entfernt |
| 1 Tag                       | 982      | 1190                     | 923                                       |
| 15 Tage                     | 998      | 1170                     | 951                                       |
| 29 Tage                     | 999      | 1042                     | 897                                       |
| 43 Tage                     | 989      | 964                      | 912                                       |

Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, nimmt die Aktivität des Trypsininhibitors im Verlauf der Lagerung nur in den Konserven ab, denen Trasylol zugefügt worden war. Diese Abnahme geht auf Kosten des Trasylols, da der Plasmatrypsininhibitor in diesen Konserven nach Entfernung des Trasylols (in Tab. III 4. Spalte) konstant erhalten bleibt.

In der Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml konnte dieses Verhalten nicht nachgewiesen werden. Das zugefügte Trasylol blieb während der gesamten Lagerung erhalten. Die Werte für den Plasmatrypsininhibitor waren in den Konserven mit 100 und 500 KIE/ml identisch und lagen über den in den ACD-

Vergleichskonserven bestimmten Werten. In Bezug auf den Inhibitorgehalt des Konservenplasmas konnte also mit den variierten Trasyloolkonzentrationen kein Unterschied nachgewiesen werden.

## 7. Kallikrein-Inhibitor (62)

Tabelle IV

| Plasmakallikreininhibitor ImE/ml |          |                          |
|----------------------------------|----------|--------------------------|
| Lagerzeit                        | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml |
| 1 Tag                            | 515      | 1078                     |
| 15 Tage                          | 568      | 1180                     |
| 29 Tage                          | 622      | 1137                     |
| 43 Tage                          | 673      | 1120                     |

## 8. Plasmin-Inhibitor

Tabelle V

| Plasmininhibitor im Plasma ImE/ml |          |                          |
|-----------------------------------|----------|--------------------------|
| Lagerzeit                         | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml |
| 1 Tag                             | 420      | 480                      |
| 15 Tage                           | 455      | 528                      |
| 29 Tage                           | 484      | 571                      |
| 43 Tage                           | 403      | 590                      |

Wie die Tabellen IV und V zeigen, lagen die Inhibitoren für Kallikrein und Plasmin in den Blutkonserven mit 100 KIE Trasylol/ml während der gesamten Lagerzeit deutlich über den bei den Vergleichskonserven gefundenen Werten. Dieses Verhalten kann nicht direkt auf die Zugabe von Trasylol zurückgeführt werden, da Trasylol in den entsprechenden Konserven vor der Inhibitorbestimmung aus dem Plasma entfernt worden war. Wie aus den Werten in Tabelle III ersichtlich ist, war diese Entfernung vollständig.

In der Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml wurde die Bestimmung des Kallikrein- und Plasmininhibitors unterlassen, da auch, wie die Trypsininhibitorbestimmung gezeigt hat, mit diesem vielfachen Überschuß an Trasylol andere Ergebnisse nicht zu erwarten waren.

## 9. Esterasen

Mit der Bestimmung der Esterasen wird die esterolytische Spontanaktivität des Konservenplasmas gegenüber einem synthetischen Ester, dem Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE), als Substrat gemessen. Hier sei noch einmal erwähnt, daß neben Kallikrein und Trypsin auch Plasmin zu dieser Esterspaltung befähigt ist. Durch eine Hemmung dieser Enzyme mit Trasylol ist demzufolge auch eine hemmende Wirkung auf die Esterspaltung zu erwarten.

Tabelle VI

| Esterasen mE/ml |                                                            |                                                                       |
|-----------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Lagerzeit       | Plasma d.Konserven<br>mit 100 KIE/ml bzw.<br>ohne Trasylol | Rekalzifiziertes Plasma<br>d.Kons.mit 100 KIE/ml<br>bzw.ohne Trasylol |
| 1 Tag           | 83,50                                                      | 157,25                                                                |
| 15 Tage         | 79,75                                                      | 110,00                                                                |
| 29 Tage         | 53,50                                                      | 90,25                                                                 |
| 43 Tage         | 49,10                                                      | 77,80                                                                 |

Wie in Tabelle VI zu erkennen ist, besteht in Bezug auf die Esteraseaktivität zwischen den normalen ACD-Konserven und den Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml kein Unterschied. Daraus ist zu folgern, daß eine esterolytische Spontanaktivität von Kallikrein, Plasmin oder Trypsin während der Lagerzeit nicht auftrat, sondern die beobachtete Spontanaktivität, die gegen Ende der Lagerungszeit zu deutlich abnahm, anderen Enzymen zuzuordnen ist.

Die Tatsache, daß im rekalzifizierten Plasma die Esterasen höher lagen, muß seine Ursache in der Auslösung der Blutgerinnung haben. Eine Aktivierung der Esterasen durch Enzyme der Blutgerinnung oder die alleinige Zufuhr von Calciumionen wäre denkbar.

# 10. Kininasen

Tabelle VII

| Kininase mE/l Plasma |          |                          |                          |
|----------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Lagerzeit            | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml | ACD-Blut +<br>500 KIE/ml |
| 1 Tag                | 77       | 93                       | 100                      |
| 14 Tage              | 98       | 109                      | 123                      |
| 29 Tage              | 84       | 116                      | 100                      |
| 43 Tage              | 89       | 102                      | 104                      |

Die Kininaseaktivität stieg im Verlauf der Lagerung in allen Blutkonserven an, wobei das Maximum zwischen 14. und 29. Lagerungstag zu verzeichnen war.

In den Konserven mit 100 und 500 KIE Trasylol/ml war eine deutlich höhere Kininaseaktivität als in den Vergleichskonserven ohne Trasylolzusatz zu verzeichnen.

# 11. Kininogen

Tabelle VIII

| Kininogen (Kallikrein-Einheiten/ml Plasma) |          |                          |                          |
|--------------------------------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Lagerzeit                                  | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml | ACD-Blut +<br>500 KIE/ml |
| 1 Tag                                      | 7,11     | 9,09                     | 10,30                    |
| 15 Tage                                    | 8,04     | 10,92                    | 11,63                    |
| 29 Tage                                    | 9,83     | 11,15                    | 12,02                    |
| 43 Tage                                    | 8,55     | 10,22                    | 10,00                    |

Zwischen dem 15. und 29. Lagerungstag war ein leichter Anstieg des Kininogengehalts in allen Blutkonserven zu beobachten. Die Kininogenfraktion war in den Konserven mit Trasylolzusatz höher als in den Vergleichskonserven. Dieses Verhalten läßt auf eine höhere Kininogenaktivierung in den Konserven ohne den Trasylolzusatz schließen. Nach den vorliegenden Befunden müßte eine Kininfreilegung vor allem in den ersten 24 Stunden der Lagerung oder schon beim Abfüllen der Konserven eintreten, da der Kininogenspiegel in den einzelnen Konserventypen nach diesem Zeitpunkt nur geringe Schwankungen aufweist und schon vom ersten Untersuchungstermin an (24 Stunden nach dem Abfüllen) in den Konserven ohne Trasylolzusatz erniedrigt war. Als Kininogenase kommt vorallem Kallikrein in Betracht, da der Kallikreininhibitorgehalt im Vergleich zum Gehalt an Trypsininhibitor und Plasmininhibitor in den Konserven ohne Trasylol am deutlichsten erniedrigt ist.

Dieser unterschiedliche Kallikreininhibitorgehalt war ebenfalls vom ersten Untersuchungstermin an zu beobachten.

Das Auftreten von größeren Mengen Kinin im Konservenplasma erscheint unwahrscheinlich, da es auch in den normalen ACD- Konserven nicht zu einer meßbaren Verringerung der Kininasen gekommen ist.

Neben dem geringen Kininogengehalt in den Konserven ohne Trasylolzusatz spricht auch die verringerte Kininasaktivität für eine gegenüber den "Trasylolkonserven" erhöhte Kininfreilegung in diesen Konserven.

## 12. Plasminogen

Tabelle IX

| Plasminogen mE/ml |               |                               |
|-------------------|---------------|-------------------------------|
| Lagerzeit         | ACD-Konserven | ACD-Konserven +<br>100 KIE/ml |
| 1 Tag             | 443           | 274                           |
| 15 Tage           | 325           | 197                           |
| 29 Tage           | 287           | 130                           |

Wie im methodischen Teil bereits dargelegt worden war, wurde das Plasminogen mit einem Überschuß an Streptokinase zu Plasmin aktiviert.

In der Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml wurde die Bestimmung des Plasminogenspiegels unterlassen, da der Plasmininhibitorgehalt in den Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml nicht nur während der gesamten Lagerzeit konstant erhalten blieb, sondern sogar etwas anstieg und somit in dieser Hinsicht auch mit diesem Überschuß an Trasylol keine anderen Ergebnisse zu erwarten gewesen wären.

Wie Tabelle IX deutlich zeigt, nahm in beiden Konservenarten der Gehalt an Plasminogen im Verlauf der Lagerung in gleicher Weise ab. Darüber hinaus geht aus der Tabelle hervor, daß Plasminogen in den "Trasylolkonserven" gegenüber den Vergleichskonserven deutlich erniedrigt war, nachdem nach früheren Untersuchungen (60) eher das Gegenteil zu erwarten gewesen wäre.

Als Ursache für dieses Verhalten kann in diesem Falle die von mehreren Autoren diskutierte Hemmung der Plasminogenaktivierung durch Trasylol nicht angeführt werden, da Trasylol in diesem Versuch in den "Trasylolkonserven" vor der Streptokinaseaktivierung zuverlässig aus dem Plasma entfernt worden ist.

Tatsache aber ist, daß in den Konserven mit dem Zusatz von Trasylol mehr Plasmininhibitor vorhanden war als in den Konserven ohne den Trasylolzusatz. Wie ja auch aus dem meßbaren Trasylolverbrauch in den Konserven während der Lagerung hervorgeht, übernahm Trasylol die Hemmung des entstehenden Plasmins, sodaß in den "Trasylolkonserven" am Ende noch mehr Plasmininhibitor vorhanden war.

Durch dieses Plus an Plasmininhibitor war demnach in diesen Konserven nicht so viel Plasminogen, bzw. nach der Streptokinaseaktivierung Plasmin nachweisbar wie in den Vergleichskonserven.

Es handelte sich in diesem Falle also nicht um eine echte Plasminogenverminderung in den "Trasylolkonserven" gegenüber den Vergleichskonserven.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen, die in beiden Konservenarten den gleichen Abfall des Plasminogenspiegels während der Lagerung erkennen ließen, erscheint es erwiesen, daß das Plasminogen durch Trasylol nicht stabilisiert, bzw. seine Aktivierung zu Plasmin nicht unterdrückt werden kann.

### 13. Fibrinogen

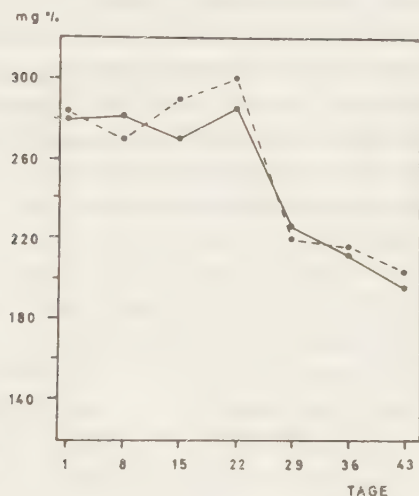


Abb.6 Fibrinogenkonzentration im Plasma v.lagernden Blutkonserven (— ACD-Konserven ohne Trasylolzusatz, --- ACD-Konserven mit Zusatz von 100 KIE Trasylol/ml.)

Wie aus beiden Summationskurven aus 3 Versuchsreihen in Abbildung 6 ersichtlich ist, war in beiden Konserventypen der Fibrinogengehalt bis zum 22.Lagerungstag praktisch unverändert. Von diesem Zeitpunkt an war ein deutlicher Fibrinogenabfall zu konstatieren, der in den Konserven mit 100 KIE Trasylol/ml etwa dieselben Ausmaße erreichte.

In der 4.Versuchsreihe wurde der Fibrinogengehalt im Plasma einer Konserve mit 500 KIE Trasylol/ml und einer Vergleichskonserven bestimmt. In diesen beiden Konserven lag der Fibrinogenspiegel grundsätzlich etwas niedriger als in

den übrigen: 250 mg% bzw. 210 mg%, blieb aber ebenso bis zum 22. Lagerungstag praktisch unverändert erhalten. Auch in diesen Konserven war von diesem Zeitpunkt an ein deutlicher Fibrinogenabfall zu verzeichnen; nach 43 Tagen Lagerungszeit betrug der Fibrinogengehalt in der "Trasylol-konserve" 180 mg%, während er in der Vergleichskonserve nur noch 150 mg% betrug, ein Ergebnis, das schlecht zu interpretieren ist, da der Ausgangswert ebenfalls niedriger als in der Konserve mit Trasyloolzusatz lag.

#### 14. Rekalzifizierungszeit

Tabelle X

| Rekalzifizierungszeit (sec.) |          |                          |                          |
|------------------------------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Lagerzeit                    | ACD-Blut | ACD-Blut +<br>100 KIE/ml | ACD-Blut +<br>500 KIE/ml |
| 1 Tag                        | 110      | 119                      | 125                      |
| 15 Tage                      | 111      | 141                      | 133                      |
| 29 Tage                      | 125      | 161                      | 193                      |
| 43 Tage                      | 132      | 172                      | 188                      |

Wie aus Tabelle X ersichtlich ist, nahm die Rekalzifizierungszeit im Laufe der Lagerungszeit kontinuierlich zu, das Konservenblut zeigte also mit zunehmendem Alter eine eindeutige Hypokoagulabilität. Schon nach 1 Lagerungstag befanden sich die Werte für die Rekalzifizierungszeit in

den einzelnen Konserven an der oberen Normgrenze. Diese Normgrenze war in einer Konserve nach diesem Zeitraum bereits überschritten.

Obwohl mit der Rekalzifizierungszeit Störungen jeder Gerinnungsphase erfaßt werden, die Methode also einen globalen Gerinnungstest darstellt, der das gesamte Gerinnungspotential erfaßt, kann mit ziemlicher Sicherheit gesagt werden, daß diese Hypokoagulabilität ihren Hauptgrund in dem raschen Thrombocytenzerfall bzw. in der "Mikrodenaturierung" (MARX) der Thrombocyten während der Abnahme und der unphysiologischen Lagerung in Glasflaschen hat. Haben doch MARX und BORST (61) in Untersuchungen zur Erklärung der Bypass-Thrombopenie nachgewiesen, daß die Thrombocyten, die im Kreislauf von diskusförmiger Gestalt sind, an den blutfremden Oberflächen entweder nur einfach hängen bleiben oder sich darauf so ausbreiten, daß sogar endothelähnliche Bilder entstehen. Ebenso würden schon wenige Sekunden genügen, um die Thrombocyten unter dem Einfluß eines geänderten Milieus (z.B. Licht, Abkühlung) etwas quellen zu lassen. Diese mikrodenaturierten Thrombocyten zeigten sich dann eher zerfallsbereit.

Neben dem raschen Thrombocytenzerfall mag auch die zunehmende Rekalzifizierungszeit durch eine Partialdefibrinierung d.h. einer unerschwelligen Gerinnung des Konservenplasmas verursacht werden. So können Hagemann-Faktor, Faktor IX und Faktor VII an blutfremden Oberflächen aktiviert werden und in Präsenz von Kalzium und Thrombocytenfaktor 3 durch Bildung von aktiver Thrombokinase die Gerinnung auslösen.

Wie aus Tabelle X weiter zu sehen ist, war die Rekalzifizierungszeit in den Konserven mit dem Zusatz von 100 bzw. 500 KIE Trasylol/ml in gleicher Weise verlängert. Zur Deutung dieses Befundes muß man annehmen, daß Trasylol einen oder mehrere Aktivierungsschritte im Verlauf der Blutgerinnung hemmt.

## Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Die Meßergebnisse stammen von Untersuchungen aus acht Blutkonserven, die den zur Zeit üblichen ACD-Stabilisator enthielten. Drei dieser Konserven waren mit 100 KIE Trasylol/ml ACD-Blut (50 000 KIE Trasylol in einer 500 ml- Konserve) und eine Konserve war mit 500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut (250 000 KIE Trasylol in einer 500 ml- Konserve) versetzt.

Bei den Konserven ohne Trasylolzusatz waren zwischen den einzelnen Konserven am jeweiligen Untersuchungstag nur unerhebliche Unterschiede in den verschiedenen Untersuchungsergebnissen festzustellen, sodaß es berechtigt erscheint, daraus eine allgemeine Tendenz des Verhaltens von Blutkonserven während einer bestimmten Lagerzeit abzulesen.

So steht der Zellzerfall im Vordergrund der beobachteten Veränderungen, der allerdings, was die Erythrocyten betrifft, nicht numerisch mit der üblichen Zählkammermethode nachgewiesen werden konnte (s.Tab.I S.44). Dagegen erbrachten andere Bestimmungen einen eindeutigen Hinweis auf die zunehmende Resistenzschwäche und den zunehmenden Zellzerfall der Erythrocyten.

So nahm sowohl die osmotische (s.Abb.1 S.41) als auch die mechanische (s.Abb.2 S.42) Resistenz nach den ersten 3 Lagerungswochen- also der derzeitigen Höchstla-

gerdauer für Blutkonserven-deutlich schneller ab, als bis zu diesem Zeitpunkt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Aktivität der Glukose-6-phosphatdehydrogenase (Glu-6-PDH) bis zu diesem Zeitpunkt ansteigt, also aus Erythrocyten stammt, die noch einen hohen Gehalt dieses Enzyms aufweisen, dann aber abnimmt, obwohl aus anderen Untersuchungen hervorgeht (Hämoglobin- und Kaliumkonzentration im Plasma Abb. 3+4), daß der Erythrocytenzerfall in den letzten 3 Lagerungswochen besonders rasch zunimmt. Es zerfallen demnach in diesem Zeitraum Erythrocyten, deren Gehalt an diesem Enzym bereits äußerst gering ist, oder es zerfallen in diesem Zeitraum deshalb so viele Erythrocyten, weil es zu einem starken Aktivitätsabfall dieses Enzyms gekommen ist. Es ist ja bekannt, daß ein Aktivitätsverlust von Glu-6-PDH die Verringerung der Bildung von Ribose-5-phosphat bedeutet, das wiederum Ausgangsprodukt von Mono- und Dinukleotiden darstellt. Es ist damit die ATP-Synthese in den Erythrocyten betroffen, zumal dann, wenn das notwendige Adenin durch Desaminierung verlorengeht.

Neben dem im Verlauf der Lagerung zu beobachtenden Hämoglobinanstieg im Plasma kann auch ein Kaliumanstieg beobachtet werden, der aber unerwartet gerade in den ersten 22 Tagen besonders rapide verläuft. Das bedeutet, daß die notwendige Energie zur Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Konzentrationsgefälles der Elektrolyte vom Erythrocyten nicht mehr aufgebracht werden kann und Kalium als "Diffusionsspezialist" ins Plasma übertritt.

Ebenso ist ein Anstieg der Aktivität an saurer Phosphatase (s. Abb. 5 S. 48) im Plasma im Verlauf der Lagerung zu verzeichnen, der in den ersten beiden Wochen

ähnlich dem Kaliumanstieg besonders rasch verlief. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß der Hauptanteil der Thrombocyten, die ähnlich den Erythrocyten einen hohen Gehalt an saurer Phosphatase aufweisen, vorzugsweise in diesem Zeitraum zerfällt, der Aktivitätsanstieg von saurer Phosphatase im Plasma also teilweise auf den besonders raschen Thrombocytenzerfall in den ersten 14 Tagen der Lagerung zurückzuführen ist.

Im weiteren Teil der Untersuchungen wurde der Effekt einer Zugabe von Trasylol zu ACD-Konserven in einer Dosierung von 100 bzw. 500 KIE/ml ACD-Blut untersucht.

Diese Zugabe von Trasylol bedeutet im wesentlichen eine Inhibierung proteolytischer Enzyme (Kallikrein, Plasmin, Trypsin), die bei einer durch diese Enzyme hervorgerufenen proteolytischen Membranschädigung und Beeinflussung der selektiven Membranpermeabilität eine protektive Wirkung auf die geformten Blutelemente entfalten könnte.

Wie die Untersuchungen aber zeigten, blieb eine Trasylolzugabe von 100 KIE/ml ACD-Blut ohne wesentlichen Effekt auf den Lagerungszustand der geformten Bestandteile des Blutes wie die Untersuchungen von osmotischer und mechanischer Resistenz, Kalium- und Hämoglobinkonzentration im Plasma, und Aktivität an Glu-6-PDH und saurer Phosphatase im Plasma ergeben haben.

In einer Konserve, der 500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut zugegeben wurde, war eine bessere mechanische Resistenz und ein geringerer Anstieg der Aktivität von saurer Phosphatase und weniger deutlich von Kalium und Hämoglobin zu verzeichnen. Ähnliche Untersuchungsergebnisse wurden schon vorher von FÜRSTENBERG (56) gemacht. Wenn die Ergebnisse in diesem Fall auch einen besseren

Lagerungszeitraum der Erythrocyten ansetzen, muß aber darauf hingewiesen werden, daß nur eine Konserve untersucht worden ist. Dabei ist dieser eventuell positive Effekt besser nicht auf die Inaktivierung proteolytischer Enzyme durch Trasylol zurückzuführen, da, wie die Inaktivierungsbestimmungen gezeigt haben, weder der Trypsininhibitor noch der Kallikrein- und Plasmininhibitor im Verlauf der Lagerung abnehmen. Wie am Beispiel des Trypsininhibitors gezeigt wurde, ergibt der Inhibitorgehalt im Plasma sowohl der ACD-Konserven mit 100 KIE als auch der mit 500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut die gleichen Werte, die während der gesamten Lagerungszeit konstant erhalten blieben. Die von FURSTENBERG erbrachten Ergebnisse von Konserven mit einem Zusatz sehr hoher Trasylolmengen (500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut), bei denen ein stabilisierender Effekt auf die Erythrocyten bei Trasylolzusatz nachweisbar war, können also nicht auf einen höheren Inhibitorgehalt zurückgeführt werden.

Bei den Inaktivierungsbestimmungen im Plasma der Konserven war der Wert für den Trypsininhibitor (s.Tab.III S.52) am höchsten, gefolgt von den Werten für den Kallikreininhibitor (s.Tab.IV S.53) und Plasmininhibitor (s.Tab.V S.53).

Wie bereits oben erwähnt, war im Beobachtungszeitraum nach einem Lagerungstag bis zum 43.Tag in allen Blutkonserven ein praktisch konstanter Inhibitorgehalt nachweisbar. Das Auftreten von Trypsin, Kallikrein oder Plasmin in diesem Beobachtungszeitraum ist somit unwahrscheinlich.

Auffällig war jedoch, daß der Kallikrein- und Plasmininhibitorspiegel, nicht jedoch der Trypsininhibitorspiegel vom ersten Untersuchungstermin an, d.h. im bereits einen Tag alten Konservenplasma bis zum Ende der Lagerungsfrist in den Konserven mit Trasylolzusatz über den Werten, die

in den normalen Konserven gefunden werden konnten, lag. Dieser Unterschied trat vorallem bei der Kallikreininhibitorbestimmung hervor und betrug 500 - 600 ImE/ml Konservenplasma.

An dieser Stelle sei noch einmal ausdrücklich betont, daß dieser erhöhte Inhibitorspiegel nicht d i r e k t durch das zugeführte Trasylol verursacht wurde, denn Trasylol wurde vor jeder Inhibitorbestimmung aus dem Plasma entfernt. Daß diese Eliminierung vollständig war, geht aus der Tabelle III (S.52) hervor, die den Trypsininhibitorspiegel in den einzelnen Konserven an den jeweiligen Untersuchungsterminen wiedergibt. Nach dieser Tabelle ist der Trypsininhibitorspiegel der "Trasylolkonserven" ebenfalls erhöht. Nach Entfernung des Trasylols ist aber dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Es steht also damit fest, daß in den Konserven mit Trasylolzusatz nach e i n e m Lagerungstag ein höherer Kallikrein- und Plasmininhibitorspiegel vorhanden ist, als in den gleich alten Vergleichskonserven.

Es muß aus diesen Befunden geschlossen werden, daß zwar nach dem ersten Lagerungstag keine Freisetzung von Kallikrein oder Plasmin erfolgt, aber eine solche entweder während der Abnahme vom Spender oder im Verlauf des ersten Lagerungstages eingetreten ist und zu einer meßbaren Bindung der entsprechenden Inhibitoren geführt hat.

Was den höheren Inhibitoranteil in den "Trasylolkonserven" betrifft, so ist dieses Verhalten nicht durch eine Unterdrückung der Aktivierung von Kallikreinogen zu Kallikrein oder Plasminogen zu Plasmin durch Trasylol verursacht. Es ist dabei eher an eine Kallikrein- und Plamininhibierung durch Trasylol zu denken, sodaß der jeweilige Plasmainhibitor erhalten bleibt.

Nachdem aus bereits bekannten Gründen eine Kallikreinak-

tivierung durch Trypsin in lagernden Konserven ausgeschlossen erscheint (konstant hoher Trypsininhibitor in sämtlichen Konserven), muß an eine Spontanaktivierung von Kallikrein gedacht werden. Am wahrscheinlichsten wird diese Spontanaktivierung, die nur während der Blutentnahme vom Spender oder im Verlauf des ersten Lagerungstages erfolgt sein kann, durch den Glaskontakt bewirkt, eine Aktivierungsmöglichkeit, die von TRAUTSCHOLD und WERLE (42) nachgewiesen worden ist.

Wenn es also zu einer wesentlichen Kallikreinfreilegung zum vermuteten Zeitpunkt gekommen ist, so müßte sich daraus eine Veränderung der Kininogenfraktion in einzelnen Konserven nachweisen lassen.

So ist aus den Werten der Kininogenfraktion (s. Tab. VIII S. 56) zu ersehen, daß die Konserven mit Trasylolzusatz einen höheren Kininogenanteil haben als die gleich alten Vergleichskonserven. Der Dosierungsunterschied von 100 bzw. 500 KIE Trasylol/ml ACD-Blut machte sich nicht bemerkbar. Diese Befunde weisen also auf eine höhere Kallikreinaktivität in den Konserven ohne Trasylolzusatz hin. Der erhöhte Kininogenanteil in den "Trasylolkonserven" war während der gesamten Beobachtungsdauer konstant vorhanden, was wiederum für eine Kallikreinfreilegung entweder während der Abnahme vom Spender oder eher noch während des ersten Lagertages der Konserven spricht.

Gut in die bisher erhobenen Befunde fügen sich die Werte für die Kininaseaktivität. Der Nachweis einer gegenüber den "Trasylolkonserven" verminderten Kininaseaktivität in den Konserven ohne den Trasylolzusatz spricht für einen höheren Verbrauch an Kininasen in diesen Konserven, was als Zeichen einer höheren Kininfreilegung in den Konserven ohne Inhibitorzusatz anzusehen ist.

Die Tatsache, daß in den Konserven mit dem Zusatz von Tra-

sylool mehr Plasmininhibitor vorhanden war, wurde bereits dahingehend interpretiert, daß Trasylol die Inhibierung von Plasmin zumindest teilweise übernimmt, sodaß daraus der höhere "native" Plasmininhibitorgehalt dieser Konserven gegenüber den Ansätzen ohne Trasylol resultiert.

Wie aus den Bestimmungen des Plasminogengehalts (s. Tab. IX S. 58) hervorgeht, nimmt in lagernden Blutkonserven der Plasminogenspiegel beständig ab, sodaß an einer beständigen, langsamen Plasminfreilegung nicht zu zweifeln ist. Das hier freiwerdende Plasmin kann aber kaum wirksam werden, da der Plasmininhibitor auch in den Konserven ohne Trasylol während der gesamten Lagerungszeit einen nur sehr geringen Aktivitätsverlust erlitt und damit das entstehende Plasmin jederzeit abgefangen werden konnte. Als Beweis dafür möchte ich die fehlende Spontanaktivität von Plasmin im Plasma 6 Wochen alter Konserven anführen. Der Abfall des Plasminogenspiegels erreichte in sämtlichen Konserven die gleichen Ausmaße. Es kommt daher eine Stabilisierung von Plasminogen, bzw. eine Unterdrückung seiner Aktivierung zu Plasmin durch Trasylol nicht in Betracht.

Der geringere Plasminogenspiegel in den "Trasylolkonserven" ist auf den erhöhten Gehalt an Plasmininhibitor in jenen Konserven zurückzuführen. Durch dieses Plus an Plasmininhibitor war demnach nicht so viel Plasminogen bzw. nach der Streptokinaseaktivierung Plasmin nachweisbar wie in den Vergleichskonserven ohne dem Zusatz von Trasylol.

Aufgrund der fehlenden Spontanaktivität von Konservenplasma für Plasmin und des nur geringen Aktivitätsverlustes des Plasmininhibitors in den Blutkonserven kam es nicht zum Auftreten einer fibrinolytischen Aktivität in den lagern-

den Blutkonserven. Es war demnach durch die zusätzliche Verabreichung eines Plasmininhibitors in Form des Trasylols ein geringerer Verlust an Fibrinogen im Konservenplasma nicht zu erwarten.

Wie die Bestimmungen des Fibrinogengehalts ergaben, erreichte der Fibrinogenschwund in allen Konserven etwa die gleichen Ausmaße.

Die hier gefundenen Ergebnisse stehen dabei im Widerspruch zu denen von JANDA und Mitarb. (57, 58, 59), nach denen bei einer Dosierung von 20 KIE Trasylol/ml ACD-Blut ein geringerer Abfall von Fibrinogen neben Faktor V und Faktor VIII eintritt. Dieser Befund wird mit einer geringeren fibrinolytischen Aktivität in diesen Konserven in Zusammenhang gebracht.

Dagegen beobachtete MAMMEN (60) bei Gerinnungsstudien während extrakorporaler Zirkulation anhand von Thrombelastogrammen, Euglobulinlysezeitbestimmungen, Profibrinolysin- und Antifibrinolysinabfall eine eindeutig gesteigerte Fibrinolyse und zeigte anhand von Vergleichsbestimmungen zwischen Heparinblut mit und ohne Trasylolzusatz, daß durch einen Trasylolzusatz der Fibrinogenabfall nicht verhindert werden kann.

Es spielt also die Fibrinolyse offensichtlich gegenüber der Partialdefibrinierung bzw. der "unterschweligen Gerinnung" (MARX 61) die geringere Rolle.

So war auch eine durch die Bestimmung der Rekalzifizierungszeit erfaßbare Beeinflussung der im Verlauf der Lagerzeit zunehmenden Hypokoagulabilität durch Trasylolzusatz nicht zu beobachten. Vielmehr konnte eine Verlängerung der Rekalzifizierungszeit in den Konserven mit Trasylolzusatz gegenüber den Vergleichskonserven beobachtet werden (s. Tab. X S. 61). Es muß deshalb angenommen werden, daß Trasylol einen oder meh-

rere Aktivierungsschritte im Verlauf der Blutgerinnung hemmt.

## Zusammenfassung

Die Meßergebnisse stammen von Untersuchungen aus acht Blutkonserven, die den zur Zeit üblichen ACD-Stabilisator enthielten. Drei dieser Konserven waren mit 100 KIE Trasylol/ml ACD-Blut und eine Konserve war mit 500 KIE Trasylol/ ml ACD-Blut versetzt.

Wie aus den Untersuchungsergebnissen hervorgeht, bedeutet die Zugabe von Trasylol zu Blutkonserven eine Erhöhung von Trypsin-, Kallikrein- und Plasmininhibitor, wobei es im Falle des Kallikrein- und Plasmininhibitors auch zu einer Erhöhung der im Plasma natürlicherweise vorhandenen Inhibitoren gekommen ist, da Trasylol die Bindung des freigelegten Kallikreins und Plasmins zumindest teilweise übernahm.

In den ersten 24 Stunden der Lagerung war eine Freilegung von Kallikrein nachweisbar und eine Spontanaktivität von Kallikrein nicht ganz auszuschließen. Nach diesem Zeitpunkt ist mit dem Auftreten einer Spontanaktivität von Kallikrein nicht zu rechnen, da der Kallikreininhibitor in genügend hoher Konzentration erhalten bleibt.

Auch im Falle des Plasmins war eine Aktivierung aus Plasminogen nachweisbar, die während der gesamten Lagerungszeit erfolgte und zu einem wenn auch geringen Verbrauch des Plasmininhibitors führte. Es kam nicht zum Auftreten einer spontanen Aktivität von Plasmin, d.h. zur Fibrinolyse.

Die Kininogenkonzentration war in den "Trasylolkonserven" gegenüber den Vergleichskonserven ohne Trasylolzusatz etwas erhöht und blieb während der Beobachtungszeit kon-

stant. Die Kininaseaktivität blieb in diesem Zeitraum ebenfalls konstant erhalten und lag im Plasma der "Trasylolkonserven" meßbar über den Werten, die in den Konserven ohne Trasylol gefunden wurden.

Wie aus der Untersuchung der Zellzahlen, der osmotischen und mechanischen Resistenz, der Konzentrationen von Hämoglobin, Kalium, Glukose-6-phosphatdehydrogenase und gesamter saurer Phosphatase hervorgeht, kann durch die Zugabe von Trasylol zu Vollblutkonserven keine Stabilisierung der geformten Blutelemente erreicht werden.

Ebenso blieb der Fibrinogenspiegel von Trasylol uneinflusst und sank in den Konserven mit und ohne Trasylol zu gleichen Teilen auf etwa 50% des Ausgangswertes ab.

Die Rekalzifizierungszeit nahm in sämtlichen Konserven im Verlauf der Lagerzeit zu und war in den Trasylolkonserven gegenüber den Vergleichskonserven erhöht.

Nach diesen Untersuchungsergebnissen erscheint ein routinemäßiger Zusatz von Trasylol zur Haltbarkeitsverlängerung von Blutkonserven nicht gerechtfertigt. Bei Operationen jedoch, bei denen mit einer gesteigerten Fibrinolyse gerechnet werden muß, ist die Verwendung von Blutkonserven mit Trasylolzusatz angezeigt.

# Literaturverzeichnis

- 1 ROUS P.,TURNER J.The preservation of living red blood cells.J.exp.Med.23 (1916) 219
- 2 BERNSTEIN R.E. Nature 172 (1953) 911
- 3 LANG K.Physiologische Chemie der Blutzellen.Handbuch der ges.Hämatologie I.Verl.Urban und Schwarzenberg 1957
- 4 BLUM K.U.Štoﬀwechselveränderungen bei Lagerung von Blut.Ber.9.Tag.Dtsch.Ges.Bluttransf.Braunschweig 1960 Bibl.haemat.vol.12 20-63 Karger 1961
- 5 LÖHR G.W.,WALLER H.D.Zellstoﬀwechsel und Zellalterung.Klin.Wschr.37 16 (1959) 833-843
- 6 ABRAHAM H.et al. The survival of Cr.<sup>51</sup> tagged inosine-preserved erythrocytes in man.Proc.of Congr.of intern.Soc.of Blood-transf.Rome 1958 Karger 1959
- 7 SCHMITT H.Probleme der Blutkonservierung.Der Einfluß von Nukleinkörpern auf die Lagerfähigkeit von Erythrocyten.Proc.of 7.Congr.of intern.Soc. of Blood-transf.Rome 1958 Karger 1959
- 8 FISCHER H.,FERBER E.,FRITZSCHE W.,WOSEGIEN F.,SPIELMANN W.Erythrocytenstoﬀwechsel und Blutkonservierung. Ber.9.Tag.Dtsch.Ges.Bluttransf.1960 Bibl.Haemat.vol. 12 76-93 Karger 1961
- 9 PRANKERD T.A.J.,ALTMAN K.J.Biochem.J.58 1954 622
- 10 HOCK A.,HUBER G.Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.308 (1957) 116
- 11 GABRIO B.W.,FINCH C.A.,HUENNEKENS F.M. J.haemat.11 (1956) 103
- 12 RUBINSTEIN D.,KASHKET S.,DENSTEDT O.F.Canad.biochem. J.34 (1956) 61
- 13 DONOHUE D.M.,FINCH C.A.,GABRIO B.W.J.clin.invest.35 (1957) 562
- 14 BLUM K.U.Bibl.Haemat.vol.12 20-63 Karger 1961
- 15 MED.WSCHAFTL.ABTLG.DTSCH.HOFMANN LA ROCHE AG.Intern. Z.f.Vitaminforschung 2/35 (1965) 138

- 16 KLEINE N. Med. Welt 10 (1964) 485-489
- 17, LIPP R. Zur Wirkung von Vit. E auf die Erythrocyten-agglutination. Ärztl. Lab. 11 (1965) 214-216
- 18 MEYER-WEGENER H. Klin. Wschr. 38/8 (1960) 407-408
- 19 TULLIS J. Red cells preservation. Proc. of the intern. Soc. of Blood-transf. Rome 1958 Karger 1959
- 20 SLOVITER H. A., RADVIN R. G. The processing and post-transfusion survival of erythrocyte-glycerol mixtures after storage at  $-79^{\circ}\text{C}$ . Proc. of the 7. Congr. of the intern. Soc. of Blood-transf. Rome 1958 Karger 1959
- 21 MERYMAN H. T., KAFIG E. Rapid freezing and thawing of whole blood. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 90 (1955) 587-589
- 22 WILLENEGGER H. Historisches und Grundsätzliches zur Frage des idealen Stabilisators. Ber. 8. Tag. Dtsch. Ges. Bluttransf. Salzburg 1959 Karger 1960
- 23 CHAPLIN H., CRAWFORD H., CUTBUSH M., MOLLISON P. L. Post-transfusion survival of red cells stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lancet i (1954) 852
- 24 MATTHES M., Erfahrungsbericht über die Verwendung von Plastikbeuteln für Blutkonserven. Ber. 8. Tag. Dtsch. Ges. Bluttransf. Salzburg 1959 Karger 1960
- 25 REISSIGL H. Konservierung von Blut in Plastikbeuteln Bibl. Naemat. vol. 16 Karger 1963 243-254
- 26 HALBERSTADT E. Das Verhalten des Gerinnungssystems bei der Lagerung in Kunststoffbehältern. Bibl. Haemat. vol. 16 Karger 1963 225-258
- 27 HEIM W., Hasse W. Ionenaustauscher und Bluttransfusion. Ber. 8. Tag. Dtsch. Ges. Bluttransf. Salzburg 1959 Karger 1960
- 28 EGLI H. Welche Aktivatoren, Fermente und Inhibitoren spielen bei der Gerinnung und Fibrinolyse eine Rolle? Therap. Ber. Bayer 2/66 (1966) 71-81
- 29 MARGGRAF W. Die Bluttraumatisierung bei Operationen mit Herz-Lungenmaschinen. Untersuchungen zur Frage auftretender Fibrinolysevorgänge. Langenbeck's Archiv f. klin. Chirurgie 298 (1961) 831
- 30 MARGGRAF W. Blutkonservierung mit Trasylol, ein Verfahren zur Vermeidung proteolytischer Fermentaktivierung. Bibl. Haemat. vol 16 Karger 1963 259-264

- 31 JANDA R. The proteolytic activity of citrated blood and some proteins of the clotting system. *Folia Histochem. et Cytochem.* vol.4 (1966) 315-324
- 32 FREY E.K., KRAUT H., WERLE E. *Kallikrein* Stuttgart Ferdinand Enke Verlag 1950
- 33 WERLE E., GÖTZE W., KEPPLER A. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem.Z.* 289 (1937) 217
- 34 ROCHA E SILVA M., BERALDO W.T., ROSENFELD G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Americ.J.Physiol.* 256 (1949) 217
- 35 WERLE E. Über Kallikrein aus Blut. III. *Biochem.Z.* 287 (1936) 235
- 36 SCHACHTER M. A delayed slow contracting effect of serum and plasma due to the release of a substance resembling Kallidin and Bradykinin. *Brit.J.Pharmacol.* 11 (1956) 111
- 37 BACK N. In vivo formation of a vasodilator substance (Plasmakinin) by plasmin *Fed.Proc.* 19 (1960) 55
- 38 TRAUTSCHOLD I. Diskussionsbemerkung. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (i.Druck)
- 39 WEBSTER M.E., PIERCE J.V. Studies on plasma Kallikrein and its relationship to plasmin. *J.Pharmacol Exp. Ther.* 130 (1960) 484
- 40 STÜRMER E., BERDE B. Kallidin und Bradykinin, vergleichende pharmakologische Untersuchungen. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch.Exp.Path.Pharmakol.* 243 (1962) 355
- 41 HABERMANN E. Fortschritte auf dem Gebiet der Plasmakinine. 27.Tag.Dtsch.Ges.Pharmakol. Wien 1962
- 42 TRAUTSCHOLD I., WERLE E. Unveröffentlicht
- 43 HABERMANN E., ROSENBUSCH G. Reinigung und Spaltung von Kininogen aus Rinderblut. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch.Exp.Path.Pharmakol.* 243 (1962) 357
- 44 WERLE E., TRAUTSCHOLD I. Kallikrein, Kallidin, Kallikreininhibitoren. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (i.Druck)
- 45 LEWIS G.P., WORK T. Formation of bradykinin or bradykinin-like substances by the action of plasmin on plasmaproteins. *J.Physiol.(London)* 135 ,7 (1956)
- 46 LEWIS G.P. Formation of plasmakinins by plasmin. *J.Physiol.(London)* 140 (1958) 285

- 47 BACK N., GUTH P.S., MUNSON A.W. On the relationship between plasmin and kinin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (i. Druck)
- 48 MARGOLIS J. The mode of action of Hageman-factor in the release of plasmakinin. *J. Physiol. (London)* 151 (1959) 238
- 49 EISEN V., KEELE C.A. The formation of plasma kinins by the action of human plasmin on human plasma. 150 (1960) 21 P.
- 50 WEBSTER M.E. Role of Hageman-factor in the activation of vasodilator activity in human plasma. *Nature (London)* 192 (1961) 180
- 51 TRAUTSCHOLD I., RÜDEL G. Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Plasmakinine. *Klin. Wschr.* 41. Jg., 7 (1963) 297-311
- 52 TRAUTSCHOLD I. Enzyme und Inhibitoren der Bildung und des Abbaus gefäßaktiver Polypeptide (Kinine). *Habilitationsschrift der Med. Fakultät München* 1965
- 53 BRINKHOUS K.M., PENICK G.D., LANGDELL R.D., WAGNER R.H., GRAHAM J.B. Physiologic basis of transfusion therapy in haemophilia. *Arch. Path.* 61, 6 (1956)
- 54 JANDA R. The proteolytic activity of citrated stored blood and some proteins of the clotting system. *Folia Histochem. et Cytochem.* vol 4, 3 (1966) 315-324
- 55 MARGGRAF W. Beobachtungen über Fibrinolyse in der Chirurgie, ihre Prophylaxe und gezielte Behandlung mit Inhibitoren. *Brun's Beitr. z. klin. Chir.* 205, 2 (1962) 121-137
- 56 FÜRSTENBERG H.S. Exp. Untersuchungen über den Einfluß des Ferment-Inhibitors Trasylol bei der Blutkonservierung. *Der Anästhesist* 14, 2 (1965) 109-113
- 57 JANDA R., MACIEJEWICZ J. The effect of addition of epsilon-Aminocaproic acid on the proteolytic activity and concentration of some coagulation proteins of the citrated stored blood. *Folia Histochem. et Cytochem.* vol 4 (1966) 439-446
- 58 JANDA R. The effect of fibrin proteolysis inhibitors on the level of fibrinogen and the activity of anti-thrombin II in citrated stored blood. *Folia Histochem. et Cytochem.* vol. 4, 4 (1966) 455-460
- 59 JANDA R., MAVIEJEWICZ J. The effect of Trasylol added to citrated stored blood on its proteolytic activity and concentration of some coagulation proteins. *Folia Histochem. et Cytochem.* vol. 4, 4 (1966) 447-454

- 60 MAMMEN E.F. Hyperfibrinolytische Blutungen in der Chirurgie, Prophylaxe und gezielte Behandlung. Ther. Ber. Bayer 2/66 (1966) 103-108
- 61 MARX R., BORST H. Störungen der Blutgerinnung und Blutstillung nach extracorporaler Zirkulation. Thoraxchir. 9 (1961) 75-84
- 62 TRAUTSCHOLD I., WERLE E. Bestimmung der Kallikrein-inhibitoren. in BERGMEYER U.-H.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verl. Chemie Weinheim/Bergstr. (1962) 883-884

Herrn Prof. Dr.Dr.E.Werle danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am klinisch-chemischen Institut der Universität München experimentell zu arbeiten, sowie für die Anleitung zu wissenschaftlichem Denken und Arbeiten.

Herrn Prof.Dr.I.Trautschold bin ich für die Unterstützung und Anregung zu meiner Arbeit zu Dank verpflichtet.

### Lebenslauf

Am 20. Februar 1942 wurde ich als Sohn des damaligen Medizinalrats Dr.med.Anton Hollweck und seiner Ehefrau Eleonore, geb.Dratschmid in München geboren.

Nach 4- jähriger Volksschulzeit in Ottobrunn und München trat ich in das Neue Realgymnasium,München über und legte dort im Juni 1961 die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1961/62 an studierte ich an der Universität München Medizin, legte im Frühjahr 1964 das Physikum ab und beendete mein Studium am 28.Juni 1967 mit der ärztlichen Prüfung.

Zur Zeit befinde ich mich in der Ausbildung als Medizinalassistent an der Augenklinik der Universität München.





